

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 579.61; 616.71; 616-001.17; 577.11

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕЛЯ  
НА ОСНОВЕ АЦЕТАТА ХИТОЗАНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ**

*М.В. Погорелов<sup>2</sup>, О.В. Калинин<sup>1</sup>, Т.В. Ивахнюк<sup>2</sup>, Р.А. Москаленко<sup>2</sup>, С.Д. Бончев<sup>2</sup>,  
С.Н. Данильченко<sup>1</sup>, А.М. Скляр<sup>3</sup>, А.Н. Калинин<sup>1</sup>, В.З. Сикора<sup>2</sup>, А.Н. Романюк*

<sup>1</sup>Институт прикладной физики НАН Украины, г. Сумы

<sup>2</sup>Сумский государственный университет, медицинский институт, г. Сумы

<sup>3</sup>Сумский государственный педагогический университет, г. Сумы

В работе проведены *in-vivo* тесты геля на основе хитозана с добавлением мирамистина, метилурацила и аскорбиновой кислоты при лечении глубоких ожогов кожи. Гель изготавливали путем растворения 2% хитозана в 0,5 процентной уксусной кислоте в течение 24 часов с последующим фильтрованием через стеклянный фильтр со средним размером пор. Для получения модифицированных гелей в раствор добавляли вышеуказанные вещества в соответствующих концентрациях. Исследования *in-vivo* проводились на лабораторных крысах-самцах с моделированными ожогами IIВ степени, которые были рандомизированы в контрольную и экспериментальную группы. Последние из 3 суток после нанесения ожога дважды в сутки производили обработку раневой поверхности разными модификациями гелей на основе хитозана. Гистологическое исследование показало уменьшение воспалительной реакции и отека в биоптатах, ускорение эпителизации поверхности травмы и сокращение сроков заживления дефекта на 2-3 суток. Микробиологические исследования выявили высокое бактериостатическое действие геля хитозана по отношению большинства представителей микрофлоры ожоговой поверхности, что позволило избежать инфекционных осложнений.

*Ключевые слова:* хитозан, ожоги, крысы, мирамистин, метилурацил, кожа.

Основной целью при лечении ожогов является максимально быстрое восстановление целостности кожного покрова. При поверхностных ожогах восстановление кожи производится с помощью местного консервативного лечения, в то время как при глубоких повреждениях возникает необходимость проведения кожной пластики [9]. Однако при этом возникает проблема дефицита донорских ресурсов кожи, что существенно затрудняет возможность одномоментной пластики всех ожоговых ран. В условиях отсутствия эффективной защиты раневой поверхности она становится входными воротами для инфицирования, через ее поверхность теряется вода, белки, электролиты и дру-

гие важные биомолекулы. При росте площади ожогов вышеупомянутые проблемы все больше влияют на течение ожоговой болезни, приводя к истощению, сепсису, а в некоторых случаях и к смерти пациента [11]. При отсутствии необходимого объема донорской кожи современная медицина обладает материалами, которые используются для временного покрытия ожоговой раны [1]. Препараты для местного лечения ран могут иметь однонаправленное действие или комплексное и разнонаправленное влияние на раневой процесс. Ляпунов и соавт. [3] сформулировали основные задачи местного лечения гнойных ран, которые, в основном совпадают с таковыми при лечении ожогов. В 1-й фазе

раневого процесса эти задачи следующие: подавление инфекции в ране, нормализация местного гомеостаза, активация отторжения некротических тканей, адсорбция продуктов микробного и тканевого распада. Во 2-й и 3-й фазах раневого процесса препараты должны препятствовать вторичной контаминации раны с одновременным подавлением роста микрофлоры, иметь протекторное действие в отношении регенерирующих тканей от механических повреждений, высушивания, обеспечить активацию обменных процессов в тканях, стимулировать репаративные процессы.

В последнее время появилось большое число раневых покрытий, отличающихся по химическому составу основы и составу лекарственных веществ [4, 6, 8]. При изучении литературных источников, патентов и данных, полученных из Интернета, были обнаружены сведения более чем о 300 раневых покрытий, находящихся на разных стадиях разработки [13]. Некоторые из них предназначены для временного, другие – для постоянного закрытия дефекта. Часть из них являются синтетическими, другие – производными биологических источников, в то время как есть и смешанный тип синтетических и биологических материалов. Вместе с тем до сих пор не существует универсального препарата, который подходит для исполь-

зования во всех фазах раневого процесса при ожогах различной глубины и удовлетворяет по фармако-экономическими характеристиками врача и пациента. Поэтому разработка и внедрение в клиническую практику новых видов и лекарственных форм материалов для закрытия ожоговых ран является актуальной медицинской проблемой современности.

Среди материалов, используемых для создания раневых покрытий встречаются коллаген, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), оксиалкилцеллюлоза, амилоза, декстран, альгинаты, хитин, хитозан, гиалуроновая кислота, декстран, акриламид, агар-агар, поливинилхлорид, полиэтилен, полипропилен, полиэтилентерефталат, полиэpsilonкапролактон и др. [6, 7, 8, 13]. Каждый материал имеет свои уникальные свойства, что позволяет использовать его в тех или иных клинических случаях. В нашей работе проведено изучение покрытия для использования при ожоговых ранах на основе хитозана.

Использование хитозана – природного полимера – обусловлено наличием у него ряда уникальных свойств, таких как биосовместимость, способность к биодеградации с образованием безвредных мономеров, нетоксичность и др. [2, 5]. Химическая структура хитозана приведена на рисунке 1.

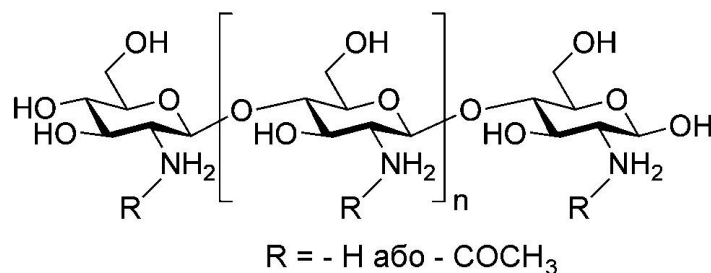


Рис. 1. Химическая структура хитозана

Хитозан не вызывает иммунной реакции организма; источники получения хитозана возобновляемые, поскольку его получают путем щелочной обработки хитина – одного из наиболее распространенных в природе полисахаридов, входя-

щий в состав панцирей ракообразных, покровов насекомых, клеточной стенки грибов и тому подобное. В отличие от других полисахаридов, хитозан имеет в своем составе первичную аминогруппу, что дает возможность создания на его ос-

нове широкого спектра производных при приемлемых условиях синтеза. Преимущества таких полимерных пленок существенные, например, более высокая степень защиты по сравнению с тканевыми материалами, а также их полная атравматичность [7, 10, 11]. Именно использование хитозана может способствовать созданию биосовместимых материалов с оптимальным соотношением цены и качества.

Поэтому целью нашей работы стало проведение комплекса исследований по получению материалов на основе хитозана, определение их физико-химических свойств, а также доклинические испытания новых синтетических материалов для лечения термических повреждений кожи.

#### **Материалы и методы**

Для получения геля хитозана использовали низкомолекулярный хитозан, полученный из панцирей камчатских крабов без всяких примесей (по результатам рентгеновской дифракции и микроскопических исследований). Готовили 2% раствор хитозана в 0,5% уксусной кислоте в течение 24 часов. Фильтровали через стеклянный фильтр со средним размером пор, рН полученного геля выдерживали не ниже 7,0. Полученный гель формирует тонкую умеренно растворимую в воде пленку на коже или полимерной подложке в течение 10 минут. Поскольку важное значение для синтеза коллагена, входящего в состав соединительной ткани имеет аскорбиновая кислота, целесообразно в лечении ожоговых ран использовать гель на основе аскорбиновой кислоты. Для приготовления такого геля использовали 1% раствор аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде. К раствору добавляли хитозан (концентрация хитозана не превышала 2%) и растворяли в течение 24 часов. Полученный гель также формирует тонкую пленку за 10-15 мин.

В состав последних гелей включали 0,5% мирамистина (бензилдиметил [3 – (миристоиламино) пропил] аммония хлоридмоногидрат) и 0,5% метилурацила (2,4-диокси-6-метил-1,2,3,4-тетрагидропири-мидин). В работе для сравнения использо-

вали растворы мирамистина и метилурацила на глицерин-желатиновой основе.

Для изучения особенностей заживления ожоговой раны при применении хитозанового геля был проведен эксперимент на 72 лабораторных крысах самцах 4-х месячного возраста. Всем экспериментальным животным наносилась ожоговая рана IIb степени на коже межлопаточной области с предварительным удалением волосяного покрова. Под наркозом на обнаженный участок кожи прикладывали стеклянную пробирку с водой которая нагревалась до температуры 95<sup>0</sup>С. Время экспозиции составляло 20-25 секунд,

Согласно цели и задач работы животные были разделены на 4 серии.

I серия (18 животных) – после нанесения ожога крыс помещали в стерильные боксы и выполняли стандартный туалет ожоговой раны с использованием стерильных марлевых повязок.

II серия (18 животных) – с 3 суток для местного лечения ожоговой раны использовали гель ацетат хитозана.

III серия (18 животных) – с 3 суток для лечения ожоговой раны использовали гель хитозана с 0,5% содержанием метилурацила и мирамистина.

IV серия (18 крыс) – с 3 суток для лечения ожоговой раны использовали мазь с 0,5% содержанием мирамистина и метилурацила на глицерин-желатиновой основе.

Животных выводили из эксперимента через 6, 9, 12 и 21 сутки после нанесения ожоговой травмы.

Для установления особенностей регенерации кожи мы применяли следующие методики:

**а. Микробиологическое исследование поверхности дефекта кожи.** Исходя из того, что для ожоговых ран характерно заражение не монокультурой, а в основном, ассоциациями микроорганизмов, для микробиологического исследования микрофлоры ожоговой раны использовали смывы, которые засеивали на различные специальные питательные среды с целью выделения и идентификации выделенных микроорганизмов.

Микробиологическое исследование осуществляли до начала нанесения хитозанового геля и после его нанесения с 3-х суток, для этого использовали бактериоскопический (окраска по методу Грама с последующей иммерсионной микроскопией) и бактериологический методы. Среди исследуемых микроорганизмов были стафилококки, стрептококки, псевдомонады, энтеробактерии и грибы рода *Candida*. Также проводились исследования чувствительности выделенных культур к 10 антибиотикам: бензилпенициллину, ампициллину, оксациллину, карбенициллину, канамицину, эритромицину, олеандомицину, тетрациклину, гентамицину, линкомицину. Выделенные чистые культуры грибов исследовались на чувствительность к 5 противогрибковым препаратам: нистатину, амфотерицину В, клотримазолу, кетоконазолу и флуконазолу.

#### **б. Гистологическое исследование.**

Под наркозом проводили удаление поврежденных участков кожи животных и подкожной фасции, фиксировали их в растворе нейтрального формалина (рН 7,2) в течение 24 часов. Образцы обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. В дальнейшем получали гистологические срезы толщиной 5-7 мкм и после депарафинизации проводили окраску препаратов гематоксилин-эозином. Анализ препаратов проводили на световом микроскопе "OLYMPUS" с видеокамерой с использованием программы захвата изображений "ВидеоТест 5.0" (Санкт-Петербург, Россия). Морфометрию проводили с помощью программы "SEO Image lab 2.0" (Сумы, Украина). Абсолютные морфометрические величины, которые позволяют объективно оценить состояние кожи не дают информации о степени патологических отклонений в отношении аналогичного показателя контроля. Поэтому при проведении морфометрии препаратов учитывали процент эпителизованной (ПЭп) и рубцовой (ПРТ) тканей, относительный объем клеточной инфильтрации (ООКИ) и поврежденных коллагеновых волокон

(ООПКВ). Сравнение процессов регенерации проводили в рамках всех экспериментальных серий.

#### **Результаты и их обсуждение**

При проведении бактериологического и микологического исследования смывов с ожоговой раны крыс I (контрольной) серии обнаружили, что константными микроорганизмами являются золотистый стафилококк (*S. aureus*), *Streptococcus salivarius*, дрожжеподобные грибы рода *Candida* (индекс постоянства – 88,8%, 66,7% и 55,5%). Часто встречались *Bacillus cereus*, *Aspergillus sp.* (Индекс постоянства – 50%, 38,9%). Относительно часто встречались бактериоиды (индекс постоянства – 22,2%) и бактерии группы кишечной палочки (16,7%). Другие микроорганизмы выделялись редко.

С целью определения ведущего возбудителя воспалительного процесса ожоговой раны были проведены дополнительные исследования, направленные на установление количественного уровня каждого штамма микроорганизма, персистирующего в содержимом ожоговой раны (табл. 1).

Из данных приведенных в таблице 1, видно, что в микрофлоре ожоговой раны крыс I серии доминировали стафилококки, которые проявляли выраженные патогенные свойства. Кроме того, у крыс I серии отмечено изменение количественного и качественного характера микрофлоры ожоговой раны в начальные сроки. Первоначально (1 – 3 сутки исследования) в посевах из ожоговых ран обнаруживаются значительно меньшее количество коагулазопозитивных стафилококков по сравнению с 5 – 7 днями эксперимента. Повышение удельного веса стафилококков, а параллельно с этим и стрептококков, может привести к развитию одного из осложнений – вплоть до сепсиса. Кроме того, количество коагулазопозитивных стафилококков уменьшается на 12 сутки (у 7 крыс до 102, у 10 – до 78 – 83 КОЕ / мл), что возможно связано с активацией клеточных и гуморальных факторов иммунной защиты.

Таблица 1

**Количественный и качественный состав микрофлоры ( $C \geq 34\%$ ) ожоговой раны у животных I серии**

Микроорганизм	День исследования											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Количество КОЕ /мл смыва с тампона											
Staphylococcus sp.	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^5$	$\leq 10^6$	$\leq 10^6$	$\leq 10^5$	$\leq 10^5$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Streptococcus sp.	$\leq 70$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^7$	$\leq 10^4$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$			
Candida sp.	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 50$	$\leq 14$	$\leq 10$
Bacillus cereus	$\leq 50$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 70$				
Aspergillus sp.		$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 70$	$\leq 30$				

Результаты исследования микробного пейзажа ожоговой раны у крыс I серии также показали, что на 10 сутки эксперимента в нем отсутствуют стрептококки. На наш взгляд, это связано главным образом с антагонистическими свойствами стафилококков, которых уже на 7 сутки эксперимента было значительно больше чем стрептококков.

Сегодня одной из актуальных проблем медицины является развитие, в результате ряда причин, устойчивости мно-

гих бактерий к антибиотикам. Именно поэтому, мы провели изучение антибиотикограммы выделенных бактерий к 10 видам антибиотиков, широко применяемых в клинической медицине.

Проведенный анализ чувствительности стафилококков и стрептококков к антибиотикам диско-диффузионным методом, обнаружил высокий уровень резистентности этих бактерий к большинству антибактериальных препаратов (табл. 2).

Таблица 2

**Доля резистентных микроорганизмов в отношении общего количества проб от крыс I серии, которые содержат данный бактериальный штам (%)**

Микроорганизм	Антибиотик/ количество резистентных штаммов									
	Бензил-пенициллин	Ампициллин	Оксациллин	Карбенициллин	Канамицин	Эритромицин	Олеандомицин	Тетрациклин	Гентамицин	Линкомицин
Staphylococcus aureus	8	14	34	6	45	55	61	56	70	48
Streptococcus sp.	25	37	9	12	8	6	12	53	41	13

Изучив грибковую микрофлору ожоговой раны, установлено, что наибольшее количество ( $\leq 104$  КОЕ / мл) грибов рода Candida была на 7 сутки эксперимента, параллельно с наибольшим количеством стафилококков ( $\leq 106$  КОЕ / мл).

Анализ чувствительности штаммов Candida spp. к противогрибковым препа-

ратам выявил значительный рост резистентных к нистатину (табл. 3) штаммов среди выделенных кандид. Так среди C.tropicalis и C. pseudotropicalis не выявлено штаммов, резистентных к антимикотикам. Но, 75% штаммов C.krusei были резистентными к флуконазолу.

Таблица 3

*Доля резистентных штаммов грибов рода Candida в отношении к общему количеству проб, которые содержат данный штамм микроорганизма (%)*

Микроорганизм	Антимикотик/ количество резистентных штаммов(%)				
	нистатин	амфотерицин В	клотримазол	кетоконазол	флуконазол
<i>Candida spp.</i>	83	3	31	25	20

Выявление, при видовой расшифровке резистентных штаммов *C.krusei* требует большего внимания. Такое внимание связано с тем, что данный вид грибов относится к наименее патогенным представителям рода *Candida*, но при снижении защитных реакций организма и при такой высокой резистентности к распространенным антимикотикам может вызвать осложнения.

Всего от 18 крыс контрольной серии, выделено и идентифицировано более 60 штаммов микроорганизмов, относящихся к 12 таксономическим группам, что свидетельствует о том, что в ожоговой ране персистирует по несколько видов одновременно. То есть, складывается впечатление, что гнойно-воспалительный процесс обуславливают ассоциации условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Так, практически у всех крыс и серии, с ожоговыми ранами, оказываются ассоциации, состоящие из 2-х или 3-х микроорганизмов. Монокультура выявлена только у 2-х крыс. Следует заметить тот факт, что вторым или третьим ассоциативным микроорганизмом выступает *Candida spp.*, на который антибиотики не действуют, более того, эти грибы могут использовать антибиотики в качестве источника азота и который проявляет определенную резистентность к антимикотикам.

Поэтому, как видно из эксперимента, в патогенезе послеожоговых осложнений важная роль принадлежит эндогенной инфекции, которая формируется под влиянием эндогенных возбудителей – представителей нормальной микрофлоры. Известно, что данные осложнения, вызванные условно-патогенными микроорганизмами, характеризуются длительностью и тяжестью течения. Это связано в том чис-

ле и с тем, что для такой микрофлоры характерна высокая устойчивость к распространенным антибиотикам, доказательством этого являются результаты антибиотикограммы. В этой связи, применение адекватного местного лечения ожогов определяет возможность снижения большинства осложнений ожоговой болезни.

Именно поэтому для опыта были взяты крысы II серии (n = 18), которым с 3-х суток для местного лечения ожоговой раны использовали гель ацетат хитозана и III серии (n = 18) – для этих животных с 3-х суток при лечении ожоговой раны использовали гель хитозана с 0,5% содержанием метилурацила и мирамистина.

Как следует из материалов, приведенных в таблице 4, видовой состав микрофлоры ожоговой раны у крыс II и III серий был менее разнообразен. Среди грамположительных бактерий преобладал *Staphylococcus aureus*. Этот вид стафилококка был обнаружен у всех крыс этих групп, но уже после третьего нанесения (на 5 сутки) геля ацетата хитозана, количество этих бактерий значительно уменьшилось (до 34 КОЕ / мл – у крыс III серии и до 102 КОЕ / мл – II серии), по сравнению с контрольной группой.

В общей структуре микрофлоры ожоговой раны у крыс II и III серий представители рода *Streptococcus* были менее многочисленными. В начале использования геля ацетата хитозана численность этих бактерий уменьшилось до  $2 \cdot 10^2$  КОЕ / мл, после второго нанесения – до 63 КОЕ / мл, а после четвертого нанесения данные бактерии не обнаруживались. Анализируя результаты бактериологического исследования микрофлоры ожоговой раны крыс III серии следует отметить, что количество *Streptococcus spp.* уже после

первого нанесения уменьшилась до 33 КОЕ / мл, но полное исчезновение этих бактерий было лишь на 9 сутки эксперимента. Данное обстоятельство, очевидно, свидетельствует о том что, гель ацетата

хитозана имеет более выраженные бактерицидные свойства по сравнению с гелем ацетата хитозана с 0,5% содержанием метилурацила и мирамистина.

Таблица 4

**Количественный и качественный состав микрофлоры ожоговой раны у крыс II и III серий**

Микроорганизм	II серия							III серия							
	День исследования/ количество (КОЕ/мл)							День исследования/ количество (КОЕ/мл)							
	3	4	5	6	7	8	9	3	4	5	6	7	8	9	10
Staphylococcus sp.	3*10 <sup>2</sup>	≤10 <sup>2</sup>	34	15	9			4*10 <sup>2</sup>	2*10 <sup>2</sup>	≤10 <sup>2</sup>	≤10 <sup>2</sup>	56	24	6	
Streptococcus sp.	2*10 <sup>2</sup>	63	12					33	27	18	13	13	6		
Candida sp.	34	33	30	30	7	3		58	55	35	24	20	20	7	
Bacillus cereus	4							4*10 <sup>2</sup>	≤10 <sup>2</sup>	52	5				

Изучение грибковой микрофлоры у крыс II и III серий в процессе лечения показало, что уже однократная обработка воспалительного очага уменьшила количество Candida spp. до 34 КОЕ / мл (II серия) и 58 КОЕ / мл (III серия).

Как, известно, «критическим» уровнем для развития инфекционного процесса является – 105 микробных тел на 1 грамм ткани раны (М. И. Кузин, Б. М. Костюченко 1990; M. Numer et al., 1975). Результаты нашего исследования показали, что значительное уменьшение обсеменения ожоговой

раны достигается уже после первого нанесения геля на основе хитозана.

Чтобы выяснить причину таких результатов, мы изучили чувствительность микроорганизмов, индекс постоянности которых был ≥ 34%: Staphylococcus spp., Streptococcus spp. и Candida spp. к мирамистину методом серийных разведений (табл. 5). Для данного опыта использовали аптечный «Мирамистин» и суспензии микроорганизмов со стандартным количеством 104КОЕ/мл среды.

Таблица 5

**Доля резистентных штаммов микроорганизмов, выделенных от крыс II и III серии (C ≥ 34%) к мирамистину (y%)**

Микроорганизм	Концентрация мирамистина в среде (%)			
	0,2	0,3	0,5	1,0
	Количество резистентных штаммов (%)			
Staphylococcus spp	48	33	22	15
Streptococcus spp.	34	25	12	6
Candida spp.	61	52	19	6

Итак, как видно из таблицы 5, в условиях опытов in vitro доказано, что мирамистин в концентрации 1% имеет более выраженное противомикробное действие в отношении микробов, которые колонизировали ожоговую рану крыс II и III серий, чем тот же мирамистин, но в меньшей концентрации. Возможно именно это стало причиной разницы в результатах лечения гелем ацетат хитозана и гелем ацетат хитозана с 0,5% содержанием мирамистина и метилурацила.

В соответствии с задачами исследования, нами была изучена чувствительность (in vitro) клинических штаммов микроорганизмов, которые часто могут вызывать послеожоговые осложнения, к ацетату хитозана, ацетату хитозана с 0,5% мирамистином и метилурацилом и антибиотиков, широко используемых в медицинской практике. Результаты исследования в таблице 6.

Таблица 6

**Чувствительность клинических штаммов микроорганизмов к антибиотикам и гелям на основе хитозана**

Препарат	Количество чувствительных штаммов, %					
	S. aureus (n=23)	S. epidermidis (n=20)	S. saprophyticus (n=20)	S. pyogenes (n=20)	S. faecalis (n=20)	P. vulgaris (n=10)
Бензилпенициллин	52,2	45,0	10,0	55,0	20,0	20,0
Ампициллин	47,8	50,0	50,0	95,0	40,0	30,0
Оксациллин	60,9	55,0	95,0	80,0	40,0	60,0
Карбенициллин	34,8	55,0	0	50,0	25,0	30,0
Канамицин	65,2	75,0	25,0	45,0	30,0	20,0
Эритромицин	73,9	80,0	100,0	40,0	40,0	30,0
Олеандомицин	60,9	65,0	55,0	10,0	20,0	30,0
Тетрациклин	52,2	70,0	0	0	0	10,0
Гентамицин	65,2	75,0	100,0	100,0	85,0	90,0
Линкомицин	73,9	70,0	45,0	95,0	35,0	70,0
Ацетат хитозана	95,7	95,0	100,0	75,0	85,0	60,0
Ацетат хитозана с 0,5% мирамистина и метилурацила	87,0	85,0	100,0	75,0	75,0	50,0
Препарат	Количество чувствительных штаммов, %					
	E. coli (n=20)	K. pneumoniae (n=20)	P. aeruginosa (n=20)	E. aerogenes (n=5)	M. morgani (n=2)	A. anitratus (n=2)
Бензилпенициллин	20,0	30,0	40,0	35,0	0	50,0
Ампициллин	60,0	55,0	65,0	50,0	50,0	50,0
Оксациллин	45,0	60,0	60,0	55,0	100,0	50,0
Карбенициллин	30,0	45,0	45,0	30,0	0	50,0
Канамицин	45,0	65,0	70,0	35,0	0	0
Эритромицин	40,0	35,0	40,0	65,0	100,0	50,0
Олеандомицин	35,0	40,0	25,0	40,0	50,0	50,0
Тетрациклин	10,0	0	25,0	35,0	0	0
Гентамицин	100,0	95,0	85,0	100,0	100,0	100,0
Линкомицин	65,0	85,0	60,0	60,0	100,0	50,0
Ацетат хитозана	85,0	65,0	95,0	70,0	50,0	100,0
Ацетат хитозана с 0,5% мирамистина и метилурацила	90,0	55,0	90,0	40,0	50,0	100,0

Как следует из материалов, приведенных в таблице 6, чувствительность патогенно-септических процессов ожоговых ран к антибиотикам зависела как от типа последних, так и от вида возбудителей.

Из числа значимых патогенов все штаммы микроорганизмов проявляли высокую чувствительность к ацетату хитозана. Наименьшую чувствительность к ацетату хитозана с 0,5% мирамистина и



метилурацила проявляли штаммы *E. aerogenes* (40,0% чувствительных штаммов), *P. vulgaris* и *M. morgani* (50,0% чувствительных штаммов), *K. pneumoniae* (55,0% чувствительных штаммов).

Так, при лечении ожоговых ран крыс II серии наблюдается положительная динамика в микробном пейзаже. Уже на 3 сутки лечения с применением геля ацетата хитозана количество стрептококков и стафилококков в ожоговых ранах уменьшилась в 2 раза. На 5-7 сутки под влиянием ацетата хитозана раны были стерильными, чего не наблюдалось у крыс I (контрольной) серии.

Использование гелевых покрытий на основе хитозана приводит к ускорению репаративных процессов, причем морфологическая картина кожи не имеет разницы в зависимости от вида покрытия.

В биоптатах на 3 сутки после нанесения геля хитозана наблюдается менее выраженный отек тканей кожи, полнокровие сосудов подкожной жировой клетчатки и дермы. Также выявляются некротические изменения и расслоения эпидермиса (на месте ожоговых пузырей), на поверхности эпидермиса оказывается корка (вследствие подсыхания экссудата). Во всех слоях кожи присутствует диффузная экссудативно-воспалительная реакция – интенсивная лейко-лимфогистиоцитарная инфильтрация, дисциркуляторные изменения. Пленка на основе хитозана при окраске гистологических препаратов гематоксилин-эозином имеет желтоватый цвет, часто с фиолетовыми оттенками (влияние гематоксилина, видимо вызванное сродством к ацетильным группам хитозана). Вследствие гистологической проводки в материале пленки часто обнаруживаются трещины, он может фрагментироваться. Проникающая способность пленки незначительная: можно увидеть четкую границу между ксеноматериалом и тканью организма (рис. 3 А).

Биоптат кожи с покрытием после 6 дней наблюдения характеризуется значительно меньшим отеком эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. По сравнению с соответствующим сроком ожога кожи грануляционная ткань в участках повреждения при-

обретает большее развитие. Тканевый детрит и некротические ткани ограничиваются воспалительной нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией. Среди воспалительного инфильтрата заметен макрофагально-гистиоцитарный компонент. В общем биоптат по сравнению с контрольной серией без коррекции быстрее очищается от некротических тканей (рис. 3 В).

Через 12 суток после ожога в коже с хитозановой пленкой наблюдаются незначительные явления дисциркуляторных изменений, минимальная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Грануляционная и соединительная ткань имеют большее распространение относительно соответствующего срока ожоговой болезни кожи (рис. 3 С). Развитие соединительной ткани отмечается во всех слоях дермы, подкожной жировой клетчатке. В эпидермисе заметная пролиферативная активность базальных слоев в виде акантотичных и паракератозных изменений плоского эпителия.

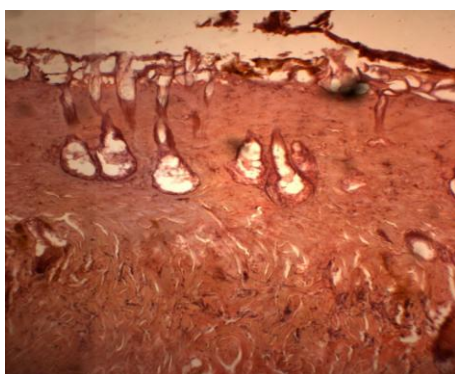
На 21 день наблюдения биоптат кожи с хитозановой пленкой не имеет признаков отека. Количество соединительной ткани является значительным, однако грубоволокнистый компонент менее выражен относительно ожога кожи без коррекции. Значительная часть поврежденного эпидермиса эпителизировалась. Деформация и нарушение структуры за счет рубцовых изменений кожи имеют место, но выраженность их незначительная (рис. 3 D).

Морфометрия поврежденных участков кожи животных контрольной серии показала начало эпителизации раны уже на 6 сутки наблюдения, при этом процент эпителизации составил  $20,4 \pm 2,9\%$  при наличии  $34,2 \pm 1,6\%$  рубцовой ткани и грануляций. Как видно из таблицы 7, использование гелевых покрытий на основе хитозана и в комбинации с мирамистином и метилурацилом приводит к росту эпителизации и уменьшению процента рубцовой ткани. В последний срок наблюдения имеется уменьшение рубца почти в 2 раза по сравнению с контролем. Клеточная инфильтрация является маркером воспалительного процесса и имеет тенденцию к уменьшению в контрольной группе живо-

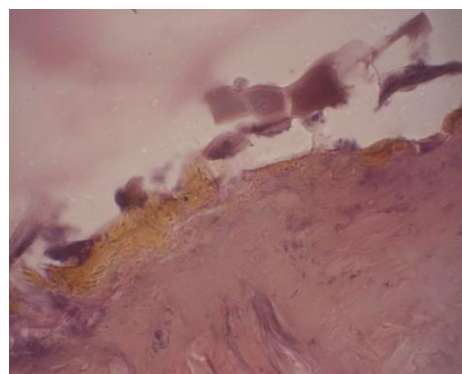
тных в соответствии со сроками сбора материала. Использование гелевых покрытий приводит к снижению относительного объема клеточной инфильтрации во все сроки наблюдения, что может быть свидетельством противовоспалительных свойств материала и проявлением выраженной антимикробной активности. Процентный объем поврежденных коллагеновых волокон является показателем функционального состояния соединительной

ткани и характеризует активность ее клеточного компонента.

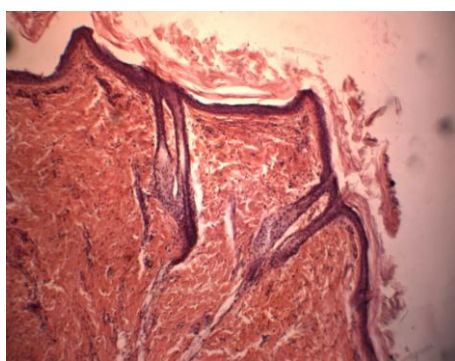
Как видно из таблицы 7, ООПКВ не имеет существенных отличий во все сроки наблюдения как в контрольной так и в экспериментальных сериях но в последних он значительно меньше. Данное обстоятельство может свидетельствовать об активном участии хитозана и его производных в обмене травмированной ткани и быть дополнительным фактором нормализации заживления ожоговых ран.



**A**



**B**



**C**



**D**

Рис. 3. Биоптат кожи крысы после нанесения ожога IIВ степени при применении геля на основе ацетата хитозана через 3 (A), 6 (B), 12 (C) и 21 (D) день после моделирования термической травмы. Окраска гематоксилин-эозин; X 200

Таблица 7

**Морфометрические параметры ожоговой раны животных контрольной и экспериментальных серий**

		ПЕп (%)	ПРТ (%)	ООКИ	ООПКВ
6 сутки	Контроль	-	-	0,097±0,008	0,036±0,001
	II серия	-	-	0,065±0,004	0,021±0,005
	III серия	-	-	0,071±0,006	0,019±0,002
9 сутки	Контроль	20,4±2,9	34,2±1,6	0,076±0,003	0,041±0,003
	II серия	29,1±3,8	26,4±4,2	0,053±0,004	0,025±0,002
	III серия	26,7±4,19	27,1±1,9	0,058±0,002	0,031±0,004
12 сутки	Контроль	45,8±6,6	36,5±1,9	0,046±0,007	0,038±0,0009
	II серия	56,8±3,3	30,28±2,4	0,035±0,002	0,020±0,004
	III серия	53,1±4,2	29,7±3,2	0,029±0,004	0,016±0,001
21 сутки	Контроль	65,4±2,6	21,3±1,8	0,017±0,002	0,029±0,003
	II серия	84,5±4,1	11,5±0,8	0,011±0,0006	0,015±0,0007
	III серия	82,6±3,8	13,9±1,5	0,010±0,0008	0,019±0,004

**Выводы**

Местное использование геля на основе ацетата хитозана и ацетата хитозана с 0,5% мирамистином и метилурацилом в терапии ожоговой раны крыс сокращает длительность гнойно-воспалительного процесса, вызванного условно-патогенными микроорганизмами, которые после аппликации геля имеют менее выраженные патогенные свойства. Применение геля на основе хитозана приводит к ускорению очищения раны от некротических масс, уменьшению количества рубцовой ткани и ускорению эпителизации раны, что приводит к сокращению длительности лечения ожоговой поверхности на 2-3 суток.

**Литература**

1. На пути к созданию живого дермального эквивалента / Р.Д. Бодун [и др.] // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2008. – №1. – С.37-38.
2. Гальбрайт Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л.С. Гальбрайт // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, №1. – С. 51-56.
3. Теория и практика местного лечения гнойных ран (Проблемы лекарственной терапии) / Н.А. Ляпунов [и др.]. – Киев, 1995. – 190 с.
4. Новые раневые покрытия в лечении ожогов и ранений / Б.А. Парамонов [и др.] // Воен.-мед. журнал. – 2002. – №4. – С. 70-73.
5. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихорева, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 365 с.
6. Burd A. Burn dressings / A. Burd // Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering / eds.: G.E. Wnek, G.L. Bowlin. – New York, NY: Marcel Dekker, Inc, 2004.
7. Chandra W. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review / W.P. Chandra, P. Sharma // Trends Biomater. Artif. Organs. – 2004. – Vol. 18, № 1. – P. 18-23.
8. Chiu T. “Xenograft” dressing in the treatment of burns / T. Chiu, A. Burd // Clin Dermatol. – 2005. – Vol. 23, № 4. – P. 419-423.
9. Chiu T. Allogenic skin in the treatment of burns / T. Chiu // Clin Dermatol. – 2005. – Vol. 23, № 4. – P. 376-387.
10. Harish Prashanth K.V. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview / K.V. Harish Prashanth, Tharanathan R.N. // Trends in Food Science & Technology. – 2007. – Vol. 18. – P. 117-131.
11. Niekraszewicz A. Chitosan medical dressings / A. Niekraszewicz // Fibres & Textiles in Eastern Europe. – 2005. – Vol. 13, №6(54). – P. 16-18.
12. Shakespeare P.G. The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries / P.G. Shakespeare // Clin

Dermatol. – 2005. – Vol. 23, №4. –  
P. 413-418.

<http://www.researchandmarkets.com/reports/604698/>.

13. The Global Market for Advanced  
Wound Care Products 2008. – URL:

### EXPERIMENTAL VALIDATION OF A GEL BASED ON CHITOSAN ACETATE FOR THE TREATMENT OF BURNS

*M.V. Pogorelov, O.V. Kalinkevich, T.V. Ivakhnyuk, F.R. Moskalenko, S.D. Bonchev,  
S.N. Danilchenko, A.M. Sklyar, A. N. Kalinkevich, V.Z. Sikora, A.N. Romanyuk*

**In the work in vivo test of the gel based on chitosan with additions of miramistin, methyluracil and ascorbic acid were performed. The gel was prepared by solution of 2% chitosan in 0.5% acetic acid during 24h with the subsequent filtration through the glass filter with the average pore size. To obtain the modified gels the above mentioned substances were added to the solution in the proper concentrations. In vivo investigations were conducted using laboratory male rats with the modeled burns of IIB degree, which were randomized in the control and experimental groups. The last 3 days after application of burns, twice a day the wound surface was treated with different modifications of chitosan-based gels. Histological study has shown the decrease of inflammation reaction and edema in biopsy material, acceleration of epithelization on the wound surface and decrease of wound repair terms by 2-3 days. Microbiological investigation revealed the high bacteriostatic action of chitosan gel against the most species of burn surface microflora, which allowed avoiding infectious complications.**

*Key words: chitosan, burns, rats, Miramistin, methyluracil, leather.*

Романюк А.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой патологической анатомии Сумского государственного университета.

Украина, 40000, г. Сумы, ул. Санаторная, д. 31, Сумский государственный медицинский университет.