

**Біоматеріали на основі хітозану для лікування опікових ран:
дослідження фізико-хімічних властивостей та in-vivo тести**

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
Розділ I Огляд літератури.....	5
Розділ II Матеріали та методи дослідження.....	12
РОЗДІЛ III Результати дослідження та їх обговорення.....	15
Висновки.....	27
Список використаних джерел.....	28

ВСТУП

Шкіра є зовнішнім покривом людського тіла, що здійснює взаємозв'язок з навколишнім середовищем. Сумарна площа шкіряного покриву дорослої людини — 1,6-2,3 м², маса шкіри досягає 5 кг, а з підшкірною жировою клітковиною — 20 кг, що відповідно становить 4-6% і 16-17% від загальної маси тіла. За кількістю (10^{11}) та щільністю клітин (6 млн/см²) шкіра є найбільшим органом людини [16].

Ушкодження шкіри займають одне з перших місць в структурі травм [11]. Особливо великого значення набули опіки шкіряного покриву, що пов'язане зі стрімким розвитком виробництва, погіршенням стану безпеки на багатьох підприємствах металургічної та вугледобувної промисловості. Виріс відсоток побутових опіків у зв'язку з ростом кількості електричного обладнання, збільшенням пожеж, тощо.

Раневий процес при опіковій травмі відрізняється наявністю великої опікової поверхні, високою частотою розвитку інфекційного процесу в рані. Бактеріальна інфікованість опікових ран значно збільшує тяжкість перебігу опікової хвороби, особливо на тлі імуннодефіцитного стану, що розвивається в даному випадку. У зв'язку із цим у тактиці ведення опікових хворих важливе місце займає терапія опікової хвороби, своєчасне закриття раневої поверхні для зниження її інфікованості, інтоксикації, прискорення строків епітелізації опікової рани [11, 18].

Сучасна світова медицина володіє цілим арсеналом різноманітних матеріалів для використання при опіках різного ступеню та локалізації [44]. На жаль в Україні майже не використовуються подібні матеріали, а вартість існуючих обмежує їх призначення для більшості верств населення. Сумісні дослідження з Інститутом прикладної фізики НАН України дозволили створити матеріал на основі хітозана для використання при опіках в якості покриття шкіряного дефекту. Вибір хітозана базується на його властивостях: бактеріостатичних, регенеративних, біодеградуючих, здатності утворювати полімери та низькій собівартості отримання препарату [2, 5, 6, 12, 21, 29, 32].

Мета роботи. Вивчити перебіг загоєння опіків шкіри при застосування різних комбінацій раневого покриття на основі хітозану.

Задачі дослідження:

1. Вивчити фізико-механічні властивості покриття на основі чистого хітозану та з додавання мірамістину та метилурацилу.
2. Виявити антибактеріальні властивості різних комбінацій матеріалу in-vitro.
3. Провести мікробіологічне дослідження змивів з рани при використанні різних комбінацій раневого покриття.
4. Визначити морфологічні особливості загоєння опіків при використанні різних комбінацій раневого покриття на основі хітозану.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Шкіра - надзвичайно складний за будовою багатфункціональний орган, її зовнішній вигляд і стан - малюнок, колір, пружність, еластичність - непостійні і перебувають у прямій залежності від загального стану організму, віку, статі, кліматичних умов, спадкових особливостей [16].

За будовою шкіра представляє собою складний морфологічний комплекс представлений шкірою та її додатками. В свою чергу шкіра складається з власне шкіри та епідермісу. Глибше розташована підшкірно-жирова клітковина. Додатками шкіри вважають наступні утвори: волосяний покрив, сальні, потові та молочні залози, нігті [16, 18].

На сучасному етапі розвитку медицини актуальним є вивчення механізмів дії факторів, які негативно впливають на біологічні об'єкти.

Одним із патологічних станів організму є опікова хвороба, що розвивається внаслідок дії екстремальних температур на локальному рівні. Опіками називають ушкодження тканин, що виникають внаслідок дії термічних, фізичних і хімічних агентів [11]. Основним патофізіологічним субстратом опікової хвороби є запалення. Запалення - комплексна місцева судинно-мезенхімальна реакція на пошкодження тканини, що викликане дією різного виду агентів. Особливо масштабні запальні процеси розвиваються після великих термічних опіків. Запалення розвивається на території гістіона і складається з тісно пов'язаних між собою фаз, що послідовно розвиваються: 1) альтерація; 2) ексудація; 3) проліферація гематогенних і гістіогенних клітин і, рідше, паренхіми органів (епітелію). У розвитку запалення провідну роль відіграють ендотеліальні клітини, оскільки саме вони, після стимуляції цитокінами і бактерійними продуктами, набувають здатності "направляти" лейкоцити до місця пошкодження. Центральну роль в процесі репарації відіграють моноклеарні фагоцити, які синтезують медіатори, що викликають проліферацію фібробластів [11].

Запалення характеризується локальним екстравазальним накопиченням лейкоцитів кров'яного русла і інших мезенхімальних клітин, білків плазми і рідини в

місцях пошкодження, інфікування або антигенної стимуляції. Саме ці фактори є морфологічним субстратом відновлення тканин в місці ушкодження та формування добреепітелізованої ділянки шкіри та малопомітного рубця за сприятливого перебігу опікової хвороби. Але на жаль ефективне лікування опікової хвороби із застосуванням сучасних знань не завжди відповідає кінцевому результату.

Одним із методів лікування опікової хвороби є місцеве використання різних покриттів [1].

Останнім часом з'явилося велике число раньових покриттів, що відрізняються за хімічним складом основи й складом лікарських речовин [3, 4, 44]. При вивченні літературних джерел, патентів і даних, отриманих з мережі Інтернет, були виявлені відомості більш ніж про 300 раньових покриттів, що перебувають на різних стадіях розробки [43]. Разом з тим дотепер не існує універсального препарату, що підходить для використання у всіх фазах раньового процесу при опіках різної глибини.

За своїм походженням препарати даної групи можна умовно розділити на природні й синтетичні.

Природні раньові покриття. Це насамперед різні варіанти консервованої шкіри або дерми.

Аллогенна шкіра. "Золотим еталоном" раньового покриття є шкіра. Короткострокове зберігання шкірних шматків, що включають дерму й епідерміс, здійснюють при температурі від 0 до + 8° С у водному середовищі (у ростових середовищах), до складу якої входять амінокислоти й глюкоза у присутності антиоксидантів і кріопротекторів [9, 10].

Препарати дерми. Ряд вітчизняних і закордонних фірм робить препарати з безклітинної дерми, консервація яких найчастіше досягається методом ліофільного висушування. Зі свинячої шкіри отримані препарати Свідерм і Аллоаск Д (Alloask D), і інші їм подібні. З донорської шкіри людини випускається покриття АллоДерм (AlloDerm), Інтегра (Integra) і Дермаграфт (Dermagraft) [20].

Амніотична мембрана. Для лікувальних цілей може використовуватися амніотична мембрана людини або тварин. Лікувальна дія зумовлена наявністю в її складі ряду компонентів позаклітинного матриксу (коллагену, фібронектину,

глікозамігліканів) і ростових факторів. На жаль, амніотична мембрана є швидкопсувним видом покриттів. На раньові поверхні варто накладати тільки свіжі мембрани з невеликими строками зберігання [34].

Синтетичні раньові покриття. У цей час єдиної класифікації синтетичних раньових покриттів не існує, але ряд авторів пропонують їх у такий спосіб:

За функціональним призначенням.

Захисні покриття. Ці покриття призначені, головним чином, для запобігання бактеріального забруднення ран. Як приклад можна привести знеболюючі плівкові покриття першої допомоги "Поліпор-А", непроникні для мікроорганізмів (з розмірами пор менше 0,2 мкм) [22].

Лікувальні покриття, залежно від використаних при їхньому виготовленні медикаментозних препаратів (антибіотики, гормони, знеболювальні речовини, гемостатики й ін.), мають різні властивості й показання до застосування [7, 13, 15].

За стійкістю покриття можна розділити на біодеградуючі (розсмоктуючі) і біоінертні. Як правило, біодеградуючі покриття виготовляють із природних полімерів (желатину, колагену, хітозану), а біоінертні - із синтетичних матеріалів.

За механізмом дії виділяють наступні види покриттів:

1) сорбційні; 2) покриття, що запобігають випаровуванню ексудату; 3) покриття, що не прилипають; 4) покриття, що розсмоктуються; 5) ізолюючі покриття.

Сорбційні біосумісні матеріали. Основною, функціональною характеристикою сорбційних покриттів є здатність поглинати з рани ексудат, кількість якого може бути значною [23]. Сорбційна здатність полімерного покриття залежить, в основному, від вільного обсягу пор, у той час як від природи полімеру залежить швидкість всмоктування рідини. Оптимальна сорбційна здатність поки не визначена. Наприклад, гігроскопічна вата має сорбційну здатність 2000-2500 %, целюлозні пов'язки - до 3400 %.

Біосумісні матеріали, що запобігають випаровуванню ексудату. Ушкодження шкіряного покриву порушують бар'єр, що перешкоджає випаровуванню тканинних рідин. Швидкість випару через ушкоджену шкіру становить 0,5-2,2 мол *(см²*год). Втрата тепла за рахунок випарування ексудату

становить 0,576 Ккал/мол. Загальним принципом створення покриттів, що запобігають випаровуванню ексудату й захищають від проникнення інфекції ззовні, є нанесення на зовнішню поверхню покриття полімерної плівки з контрольованої паропронкністю або ущільнення зовнішньої поверхні покриття методом гарячого пресування. Вважається, що оптимальна швидкість випаровування через раньове покриття лежить в межах 6-12 мг/см² [19].

Біосумісні матеріали, що не прилипають. Найбільш серйозним недоліком гідрофільних покриттів є те, що процедура зміни пов'язки стає хворобливою й травмує рану. Цю проблему вирішують шляхом гідрофобізації зверненого до рани шару покриття, як правило, виконуючи його з гідрофобного синтетичного полімеру. Однак, такі покриття не прилягають щільно до рани й мають знижену швидкість всмоктування, що призводить до скупчення ексудату на рані [19].

Біосумісні матеріали, що розсмоктуються. Іншим варіантом вирішення проблеми створення сорбційних покриттів є застосування покриттів на основі розчинних полімерів, або на основі біодеградуючих матеріалів.

1. Біосумісні матеріали з полісахаридів. Описано покриття, що розсмоктуються, з натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (КМЦ), оксіалкілцелюлози, амілози, декстрану, альгінатів, хітину, хітозану, гіалуронової кислоти й ін. В основі здатності цих матеріалів до розсмоктування лежить їх водо- і плазморозчинність. Під впливом альгінатів, хітозану, гіалуронової кислоти відзначене прискорення процесів загоєння ран і опіків, їхня стимулююча дія на розвиток грануляційної тканини сприяє епітелізації. Присутність на рані полісахаридних матеріалів сприятливо позначається на репараційних процесах на всіх стадіях лікування рани [14, 31].

2. Біосумісні матеріали на основі колагену. До цінних властивостей колагену відноситься його здатність стимулювати фібрилогенез, розсмоктуватися й заміщуватися живою тканиною. Для раньових покриттів він використовується у вигляді губки, волокнистої маси або матеріалів типу фетру. Колагенові губки одержують шляхом сублімаційного сушіння гелю колагену, іноді такий гель

додатково спінюють пропусченням інертного газу. У ряді випадків губка містить пластифікатор, наприклад 10-25 % гліцерину [24].

Ізолюючі біосумісні матеріали. До таких покриттів відносяться еластичні полімерні плівки. Ці покриття не дуже вдалі, тому що в них відсутній істотна сорбційна здатність.

Покриття у вигляді гелів мають багато переваг: прозорість; щільний контакт із ранною, що перешкоджає скупченню ексудату; безболісність видалення. Однак, на практиці покриття у вигляді гелів часто малоефективні через малу механічну міцність, схильності до пересихання, малу сорбційну здатність [30].

Таким чином, з існуючих в наш час різноманітних асортиментів полімерних покриттів на рани й опіки, покриття, що розсмоктуються, найбільшою мірою відповідають всім медико-біологічним вимогам, можуть бути корисні як на ранніх стадіях лікування ран і опіків, так і на більш пізніх стадіях. Отже, розробка полімерних покриттів, що прилипають та покриттів, що розсмоктуються, з високою сорбційною здатністю й різними строками розсмоктування, є в наш час найбільш актуальним напрямком в області створення ефективних аплікацій на рани й опіки [39].

За формою виготовлення й способу застосування можна виділити наступні варіанти покриттів:

1. Губки; 2. Гелеутворюючі покриття; 3. Плівкові покриття; 4. Покриття, що формуються при розпиленні композиції у вигляді аерозолю.

Комбіновані покриття. Губки. Для губок характерна наявність розвиненої пористої структури, що забезпечує їм високу абсорбуючу здатність і високу проникність для газів і кисню. Губки виготовляють із природних (колагену, хітозану, альгінових кислот, целюлози й ін.) [25, 27] і синтетичних полімерів (поліуретану й ін.). Для додання їм специфічних лікувальних властивостей проводять спеціальну обробку різними медикаментозними засобами (антибіотиками, протеолітичними ферментами, гемостатичними агентами, і т.д.) [8, 17].

Існують препарати, що складаються із двох видів полімерів, зокрема з колагену й хітозану. Так, наприклад, нещодавно була розроблена губка "Цитотімакол", до складу якої входить антигіпоксанти цитохром С і імуностимулятор – тималін [13].

Гелеутворюючі й гідрогелеві покриття. Гелеутворюючі покриття формуються при змочуванні ексудатом нанесеного на раньові поверхні у вигляді порошку різних речовини. Найчастіше по суті ці покриття виконують функцію дренажних сорбентів. Ці речовини забезпечують відтік у пов'язку не тільки раньового ексудату, але й мікроорганізмів. Покриття даного типу одержують із різних синтетичних і природних полімерів (похідні метилметакрилату, декстрану, акриламід, агар-агару і ін.) [40].

Гідрогелеві покриття. До препаратів цього типу можна віднести покриття "Ineran" (отримують шляхом полімеризації амінокислот лейцину й гліцину), "Галактон" і "Галагран" (на основі пектину, що мають властивості сорбенту, стимулятора репарації, антибактеріального препарату й анестетика), з гідроксиметилцелюлози й інших [14].

Плівкові раньові покриття. У наш час застосовуються плівки з різних видів природних і синтетичних матеріалів: колагену, полівінілхлориду, поліетилену, поліпропілену, поліетилентерефталату, поліепсілонкапролактону й ін. Найбільш відомими представниками цього типу плівок, що з'явилися в останні роки, є плівки "Оп-Сайт" ("Op-Site"), "Тегадерм" ("Tegaderm") і "Кутінова-Гідро" ("Cutinova hydro"). Ці препарати зручні у використанні, еластичні, добре фіксуються до раньової поверхні, прозорі [40].

Раневі покриття з малою адгезивністю. Окрему групу раньових покриттів, що широко застосовуються в комбустіології, становлять покриття, що не прилипають, які підрозділяються на наступні різновиди:

- металізовані;
- зроблені з парафінізованої марлі;
- виконані з марлі, просоченої мазями або емульсіями.

Аерозольні плівкоутворювальні композиції були вже розглянуті раніше. У СРСР і СНД раніше застосовувалися препарати "Акріласепт", "Ліфузоль", "Статізоль", "Наксол" (ВНР). "Акріласепт" не знайшов широкого застосування через відносно низку паропронкність й адгезивність. За кордоном випускаються аерозолі "Нобекутан" і " Уайп-Він" [17].

Біотехнологічні раньові покриття. Даний клас раньових покриттів є найсучаснішим і, очевидно, найперспективнішими. Вичерпної класифікації такого роду покриттів у наш час не існує.

За способом одержання остаточної лікувальної форми їх можна розділити на готові до застосування й на ті, що формуються безпосередньо в рані. Готові до вживання раньові покриття це ті, які остаточно формуються в лабораторії й далі доставляються в клініку, де їх переносять на раньові поверхні [40, 43]. Серед них, у свою чергу, можна виділити три групи композицій:

1. Різні варіанти "живого еквівалента шкіри", що складаються з так званого "дермального еквівалента" (колагенового гелю з інокульованими в його склад живими фібробластами), на поверхні якого культивуються клітини епідерміса.
2. "Замінники шкіри, що культивуються" (cultured skin substitutes).
3. Композиції, що займають проміжне положення між двома першими групами.

Таким чином, з огляду на велику кількість існуючих раньових покриттів, котрі характеризуються різними властивостями (складом, технологією отримання, методом використання та врешті-решт ціною), перспективним є напрямок створення такого покриття, яке при мінімальному складі компонентів має максимум лікувальних властивостей; біологічну, біохімічну, морфологічну та імунологічну відповідність шкірі та мати економічно-обгрунтовану ціну з метою використання їх у пацієнтів з низьким рівнем прибутків та у соціально незахищених прошарках населення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Дослідження було виконано на 72 білих безпорідних щурах самцях 4-х 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 знаходилися в умовах належного догляду.

Матеріали дослідження:

Матеріал для покриття дефекту отримували в Інституті прикладної фізики НАН України. В нашій роботі ми використовували 2 види матеріалів:

1. Гель ацетат хітозану [26, 36, 37];
2. Гель хітозану з 0,5% вмістом мірамістину та метилурацилу [28, 38].

При нанесенні гелю на раневу поверхню відбувається утворення плівки товщиною 2–5 мм протягом 7-10 хвилин.

Всім експериментальним тваринам під наркозом наносилась опікова рана Пв ступеню на шкірі міжлопаткової ділянки. Попередньо відбувалося видалення волосяного покриву. Під наркозом на оголену ділянку шкіри прикладали скляну пробірку з водою яка нагрівалась до температури 95⁰С. Час експозиції складав 20-25 секунд,

Відповідно до мети та задач роботи тварини були розділені на 4 серії.

I серія (18 тварин) – після нанесення опіку щурів поміщали в стерильні клітки та виконували стандартний туалет опікової рани з використанням стерильних марлевих пов'язок.

II серія (18 тварин) – з 3 доби для місцевого лікування опікової рани використовували гель ацетат хітозану.

III серія - з 3 доби для лікування опікової рани використовували гель хітозану з 0,5% вмістом метилурацилу та мірамістину.

IV серія (18 щурів) - з 3 доби для лікування опікової рани використовували мазь з 0,5% вмістом мірамістину та метилурацилу.

Тварин виводили з експерименту через 6, 9 та 12 днів після нанесення опікової травми.

Методи дослідження.

1. Вивчення фізико-хімічні властивостей покриття.

а. Структура покриття. Для вивчення внутрішньої будови полімеризованого покриття проводили напилення поперечного зрізу плівки золотом у вакуумному універсальному пості (ВУП-5) з подальшою візуалізацією поверхні на растровому електронному мікроскопі РЕМ-102 (Selmi, Україна). В подальшому проводилась морфометрія одержаних світлин з метою визначення діаметру пор. Виміри проводили за допомогою програмного забезпечення для біологічних досліджень "SEO image lab" (SEO, Україна).

в. Сорбційна здатність. Сорбційну здатність матеріалу вивчали після отримання плівки з гелю шляхом поміщення зразка в дистильовану воду на 24 години. Відсоток абсорбованої води визначали через 1, 2, 3, 6, 12 та 24 години за формулою:

$$W_{sw} = \frac{W_w - W_d}{W_d} 100\%$$

де W_{sw} – сорбційна здатність зразка, W_w – маса зразка після перебування у воді, W_d – маса сухого зразка.

с. Швидкість біодеградації. Визначення швидкості біодеградації проводили шляхом поміщення плівки в розчин лізоциму у фосфатному буфері Соренсена рН=7,2 при температурі 37⁰С. Аналіз результатів проводили через 24, 48 та 72 години. Швидкість біодеградації D визначали за формулою [41]:

$$D = \frac{W_o - W_t}{W_o} 100\%$$

де W_o – маса сухого зразка, W_t – маса зразка через проміжок часу t .

2. Дослідження впливу гелю на основі хітозану на загоєння опікової рани.

а. Гістологічне дослідження. Під загальним наркозом проводили видалення пошкоджених ділянок шкіри тварин до підшкірної фасції та фіксували їх в розчині нейтрального формаліну (рН 7,2) протягом 24 годин. Зразки зневоднювали в зростаючих концентраціях спирту та заливали в парафін. В подальшому отримували

гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм та після депарафінації проводили забарвлення препаратів гематоксилін-еозином та за ван-Гізон. Аналіз препаратів проводили на світловому мікроскопі "OLIMPUS" з відеокамерою з використанням програми захвату зображень "ВидеоТест 5,0" (Санкт-Петербург, Росія). Порівняння процесів регенерації проводили в межах всіх експериментальних серій.

в. Мікробіологічне дослідження поверхні дефекту шкіри. Виходячи з того, що для опікових ран характерне зараження не монокультурою, а в основному, асоціаціями мікроорганізмів, для мікробіологічного дослідження мікрофлори опікової рани використовували змиви, які засівали на різні спеціальні живильні середовища з метою виділення й ідентифікації мікроорганізмів.

Схема виділення й ідентифікації мікроорганізмів з опікової рани

Змив з опікової рани



1 мл стерильного фіз.розчину

ПЕРВИННИЙ МІРНИЙ ПОСІВ РОЗВЕДЕНОГО 1:10 МАТЕРІАЛУ
НА СПЕЦІАЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА:



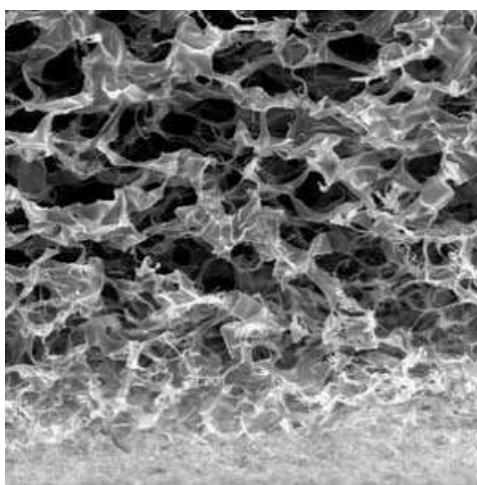
1) Жовточно-Сольовий агар – для виділення стафілококів; 2) Цукровий агар і кров'яний агар – для виділення стрептококів; 3) Середовище Ендо – для виділення бактерій групи кишкової палички; 4) Агар Цейслера – для виділення анаеробних бактерій – клостридій; 5) Універсальне середовище – МПА – для виділення синегнойної палички, сарцин, бацил; 6) Середовище Сабуро – для виділення грибової мікрофлори.

Для ідентифікації виділених чистих культур бактерій і грибів вивчали їхні морфологічні, культуральні, біохімічні та антигенні властивості.

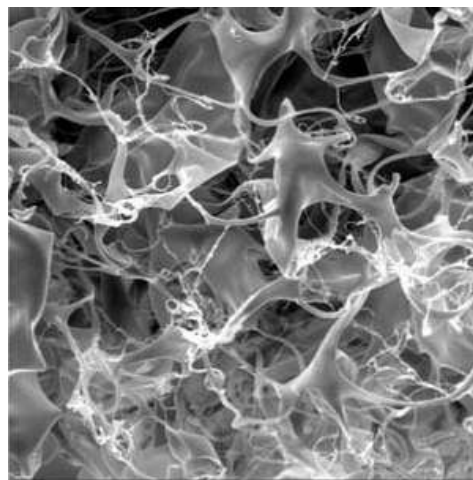
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Вивчення фізико-хімічні властивостей покриття

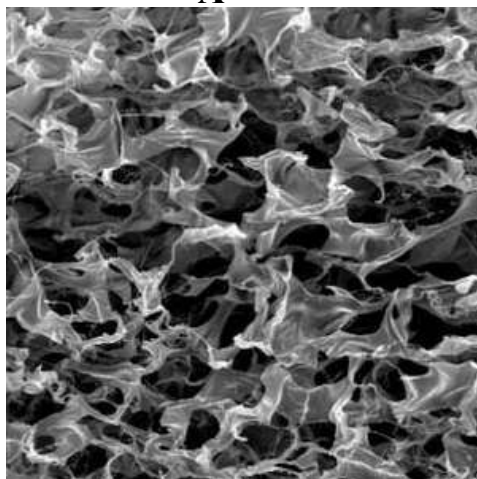
Після нанесення гелю на поверхню дефекту відбувається утворення плівки товщиною 2-5 мм протягом 7-10 хвилин. За даними ряду досліджень саме від будови плівки залежать біологічні властивості покриття. В нашому дослідженні ми вивчали будову плівок з чистого хітозану (ацетат хітозану) та покриттів з додаванням 0,5% мірамістину та метилурацилу. Як видно з малюнку (рис. 1), при висушуванні гелі на основі хітозану утворюють пористі структури, в яких можна виділити як мікро- так і макропори.



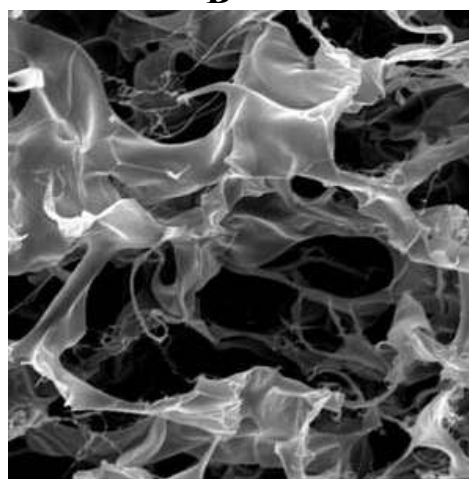
A



B



C



D

Рисунок 1. Скануюча електронна мікроскопія плівок на основі хітозану: А, В – ацетат хітозану; С, D – хітозан з 0,5% мірамістину та метилурацилу. Збільш: А, С - X300; С, D - X800.

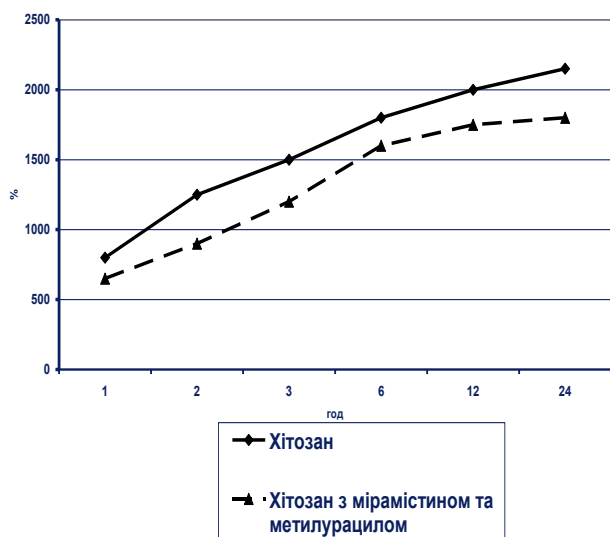
Розміри мікропор плівки з ацетату хітозана складають від 3 до 5 мкм, в той час як максимальний діаметр макропор становить 25 мкм. Додавання до хітозану

антисептика мірамістину та регенеруючого засобу метилурацилу призводить до утворення пор більшого діаметру. Так мікропори даного матеріалу знаходяться в межах 10-15 мкм, розмір макропор становить від 45 до 65 мкм. За даними Hyunmin O. та співавт. саме розмір пор є важливим для таких властивостей як сорбційна здатність та проникність мембрани [35]. Зростання кількості та розмірів макропор призводить до зниження загальної площі їх поверхні, зменшуючи сорбційні властивості та призводить до збільшення проникності покриття, що може призвести до проходження макромолекул (напр., білків) через його поверхню. Таким чином гель на основі ацетата хітозана утворює плівку з меншим діаметром пор, що потенційно збільшує її сорбційні властивості та зменшує проникність для макромолекулярних сполук.

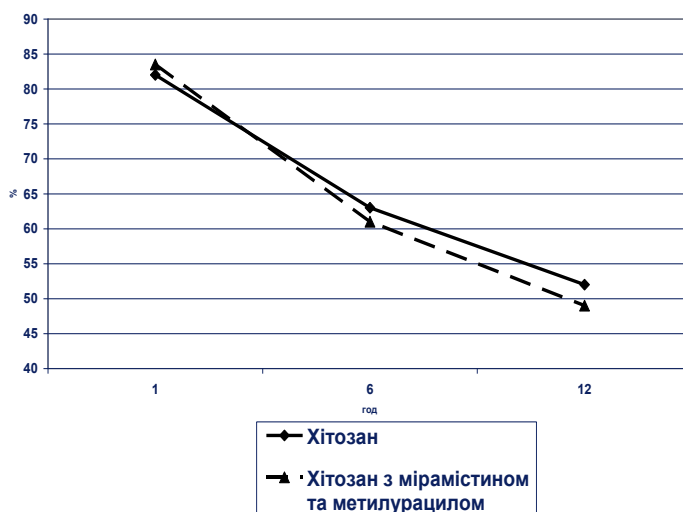
Визначення сорбційної здатності матеріалів підтверджує висновки, отримані при морфологічному дослідженні матеріалів. Так, покриття на основі ацетату хітозана показало більшу швидкість абсорбції води ніж матеріал з додаванням мірамістину та метилурацилу. Як видно з графіку (рис. 2 А), обидва матеріала володіють задовільною сорбційною здатністю. Але спостерігається достовірна різниця в усі терміни спостереження. Так через 1 годину відсоток абсорбованої води склав 800% та 650% відповідно, в подальшому відбувається поступове зростання відсотка абсорбції. Через 6 годин він склав для ацетату хітозана 1800%, для матеріалу з додаванням мірамістину та метилурацилу – 1600%. В подальшому швидкість абсорбції води для матеріалу з домішками зменшується, в той час як для покриття з ацетату хітозана залишається на попередньому рівні. Наявність задовільних абсорбуючих властивостей та її швидкість є однією з основних характеристик матеріалів, що використовуються для покриття опікових ран [42]. Наявність таких властивостей в досліджуваних зразках може попередити втрату води з поверхні опікової рани, зберегти сталість складу екстрацелюлярного простору та полегшити транспорт іонів та поживних речовин в травмованих тканинах.

Біодеградація хітозанових плівок призводить до вивільнення молекул хітозану, що мають унікальні біологічні властивості. Він може виконувати

специфічні клітинні функції, індукуючи цитокіни, що сприятливо впливають на гістоархітекtonіку сполучної тканини, покращують остеогенез, ангіогенну активність, стан регенерату шкіри [33].



А



В

Рисунок 2. Динаміка відсотка абсорбованої рідини (А) та швидкості біодеградації (В) плівками з ацетату хітозана та з додаванням мірамістину та метилурацилу.

Хітозан може слувати попередником ряду глікозаміногліканів, зокрема хондроїтин-4-сульфату, хондроїтин-6-сульфату, кератансульфату, гіалуронової кислоти, які беруть участь в утворенні і метаболізмі тканин, в тому числі шкіри. Крім того деградація покривного матеріалу призводить до зменшення травмування поверхні рани при зміні недеградуючих пов'язок.

Як видно з графіку (рис. 2 В) обидва види покриття володіють однаковою швидкістю біодеградації. Протягом 1-ї години відбувається втрата 18% та 17,5% попередньої ваги зразків, через 6 годин відсоток втрати маси складає відповідно 37% та 39% і через 12 годин – відповідно 48% та 51%. Швидкість біодеградації дозволяє захищати поверхню рани протягом 12 годин і в той же час не перешкоджає проведенню маніпуляцій в місці ушкодження, які можна проводити 2 рази на добу без травмування поверхні рани.

2. Дослідження впливу гелю на основі хітозану на загоєння опікової рани.

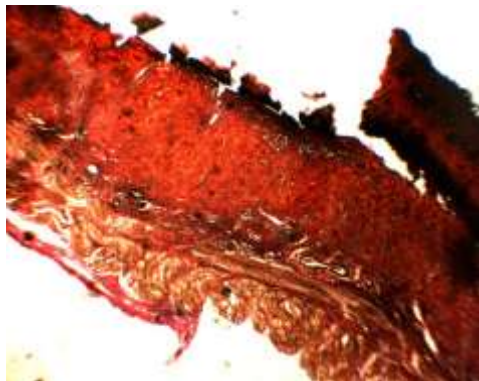
У мікропрепаратах на 3 добу після опіку спостерігається різко виражений набряк епідерміса та дерми, повнокров'я судин мікроциркуляторного русла. Виявляються некротичні зміни та розшарування епідермісу (на місці опікових міхурців), дифузна змішаноклітинна нейтрофільно-лімфоцитарна інфільтрація, яка захоплювала всі шари шкіри, наявна деяка кількість макрофагів та гістіоцитів. Подекуди на поверхні епідермісу утворюється кірка, некротизовані волосяні фолікули та потові залози (Рис. 3 А). Підшкірна жирова клітковина з розширеними судинами, периваскулярним набряком, дифузною ексудативно-запальною реакцією.

При дослідженні біоптатів шкіри після 6 днів спостереження явища набряку елементів шкіри дещо зменшуються, проте залишається виражена запальна інфільтрація. Серед компонентів запального інфільтрату більш значим стає макрофаго-гістіоцитарний компонент. У дермі збільшується кількість гемокапілярів. У базальних шарах епідермісу виявляються ознаки проліферативної активності – ядра епітеліоцитів збільшуються. Некротично змінені тканини (детрит) відмежовуються від збережених запальним валом з нейтрофілів, лімфоцитів, гістіоцитів. У ділянках пошкодження з'являється грануляційна тканина (Рис. 3 В).

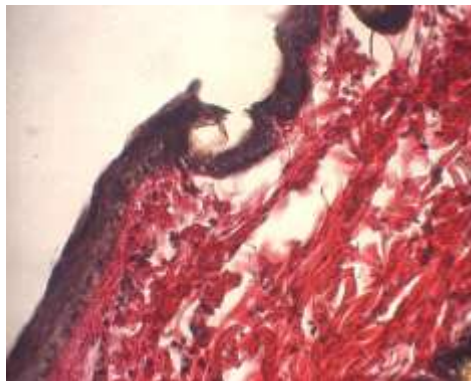
У тканинах шкіри через 12 діб після опіку спостерігаються помірний набряк, зменшуються явища запальної інфільтрації – серед інфільтрату переважають лімфоцити та гістіоцити. На відміну від попередніх термінів спостереження збільшується кількість грануляційної тканини. Серед морфологічних компонентів шкіри значного розвитку набуває сполучна тканина, кількість якої значно збільшується. Сполучна тканина представлена численними колагеновими волокнами, фібробластами (Рис. 3 С). Розвиток сполучної тканини відмічається в усіх шарах дерми, підшкірній жировій клітковині. В епідермісі наявна висока проліферативна активність базальних шарів.

У тканині шкіри зникають ознаки набряку. Залишаються мінімальна запальна інфільтрація. Кількість сполучної тканини є значною, при чому відбувається збільшення грубоволокнистого компоненту, виявляються поодинокі зміни за типом гіалінозу. Від грануляційної тканини залишилися лише слідові зміни

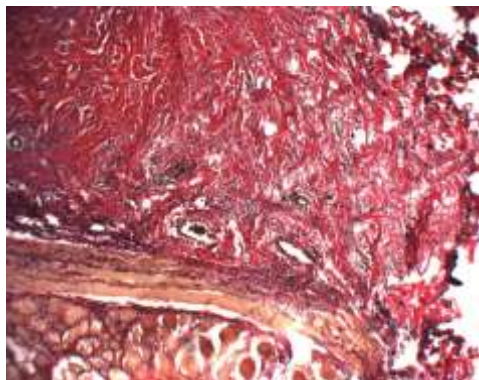
(перетворюється на рубцеву). В епідермісі відбулася помітна епітелізація пошкоджених ділянок. Оцінюючи загальний вигляд шкіри можна відмітити деяку деформацію і порушення структури за рахунок рубцевих змін, дисконкомплексацію елементів морфологічної системи шкіра (Рис. 3 D).



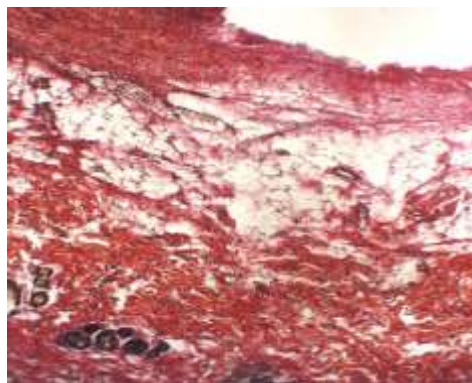
A



B



C



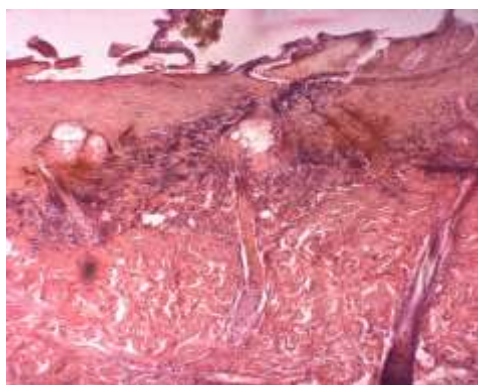
D

Рисунок 3. Шкіра щура після нанесення опіку Ів ступеню через 3 (A), 6 (B), 12 (C) та 21 (D) день після моделювання термічної травми. Забарвлення за ван-Гізон. Збільш X 200

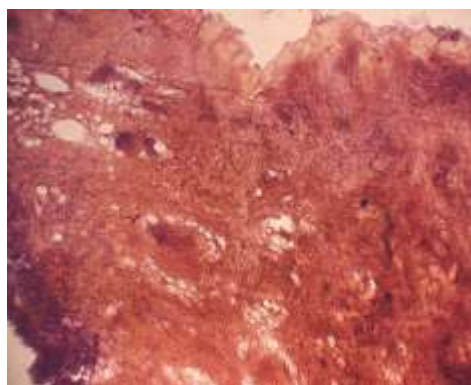
Використання селективних покриттів на основі хітозану призводить до прискорення репаративних процесів, при чому морфологічна картина шкіри не має різниці в залежності від виду покриття.

У біоптатах на 3 добу після корекції опіку хітозаном спостерігається різко менш виражений набряк тканин шкіри, повнокров'я судин підшкірної жирової клітковини та дерми. Також виявляються некротичні зміни та розшарування епідермісу (на місці опікових міхурців), на поверхні епідермісу виявляється кірка

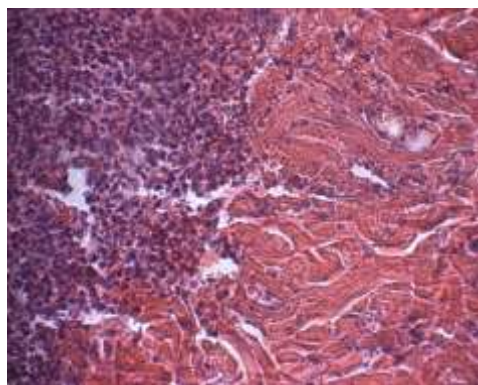
(внаслідок підсихання ексудату). У всіх шарах шкіри присутня дифузна ексудативно-запальна реакція – інтенсивна лейко-лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, дисциркуляторні зміни. Плівка на основі хітозану при забарвленні гістологічних препаратів гематоксилін-еозином має жовтуватий колір, часто з фіолетовими відтінками (вплив гематоксиліну, мабуть спорідненість до COOH-груп хітозану). Внаслідок гістологічної проводки у матеріалі плівки часто виявляються тріщини, він може фрагментуватися. Прониклива здатність плівки незначна: можна побачити чітку межу між ксеноматеріалом та тканиною організму (Рис. 4 А).



А



В



С



Д

Рисунок 4. Шкіра щура після нанесення опіку ІІв ступеню при застосуванні гелю на основі хітозану через 3 (А), 6 (В), 12 (С) та 21 (D) день після моделювання термічної травми. Забарвлення гематоксилін-еозин та за ван-Гізон. Збільш X 200

Біоптат шкіри з покриттям після 6 днів спостереження характеризується значно меншим набряком епідермісу, дерми та підшкірної клітковини. У порівнянні з відповідним терміном опіку шкіри грануляційна тканина у ділянках пошкодження набуває більшого розвитку. Тканинний детрит та некротичні тканини обмежуються запальною нейтрофільно-лімфоцитарною інфільтрацією. Серед компонентів запального інфільтрату помітний макрофаго-гістіоцитарний компонент. Взагалі

біоптат у порівнянні опіковою шкірою без корекції швидше очищається від некротичних тканин (Рис. 4 В).

Через 12 діб після опіку у шкірі з хітозановою плівкою спостерігаються незначні явища дисциркуляторних змін, мінімальна запальної лімфо-гістіоцитарна інфільтрація. Грануляційна та сполучна тканина мають більше поширення відносно відповідного строку опікової хвороби шкіри (Рис. 4 С). Розвиток сполучної тканини відмічається в усіх шарах дерми, підшкірній жировій клітковині. В епідермісі помітна проліферативна активність базальних шарів у вигляді акантотичних та паракератозних змін плоского епітелію.

На 21 день спостереження біоптат шкіри з хітозановою плівкою без ознак набряку. Кількість сполучної тканини є значною, проте грубоволокнистий компонент менш виражений відносно опіку шкіри без корекції. Значна частина пошкодженого епідермісу епітелізувалась. Деформація і порушення структури за рахунок рубцевих змін шкіри мають місце, але вираженість їх незначна (Рис. 4 D).

Таким чином, застосування гелю на основі хітозану призводить до прискорення очищення рани від некротичних мас, зменшення кількості рубцевої тканини та прискорення епітелізації рани.

При проведенні бактеріологічного та мікологічного дослідження змивів з опікової рани щурів I (контрольної) серії виявили, що константними мікроорганізмами стають золотистий стафілокок (*S. aureus*), *Streptococcus salivarius*, дріжджоподібні гриби роду *Candida* (індекс постійності – 88,8%, 66,7% та 55,5%). Часто зустрічалися *Bacillus cereus*, *Aspergillus sp.* (індекс постійності – 50%, 38,9%). Не часто зустрічалися бактероїди (індекс постійності – 22,2%) та бактерії групи кишкової палички (16,7%). Інші мікроорганізми виділялися рідко.

З метою визначення провідного збудника запального процесу опікової рани були проведені додаткові дослідження, направлені на встановлення кількісного рівня кожного штаму мікроорганізму, що персистує у вмісті опікової рани (таблиця 1).

Із даних наведених в таблиці 1, видно, що у мікрофлорі опікової рани щурів I серії домінували стафілококи, які проявляли виражені патогенні властивості. Крім

того, у щурів I серії відмічена зміна кількісного та якісного характеру мікрофлори опікової рани у початкові дослідні строки. Первинно (1 – 3 доба дослідження) у посівах з опікових ран виявляються значно менша кількість коагулазопозитивних стафілококів у порівнянні з 5 – 7 днями експерименту. Підвищення удільної ваги стафілококів, а паралельно з цим і стрептококів, може призвести до розвитку одного з ускладнень - до сепсису. Крім того, кількість коагулазопозитивних стафілококів зменшується на 12 добу (у 7 щурів до 10^2 , у 10 – до 78 – 83 КУО/мл), можливо це пов'язано з активізацією клітинних та гуморальних факторів імунного захисту.

Таблиця 1

**Кількісний та якісний склад мікрофлори ($C \geq 34\%$)
опікової рани у щурів I серії**

Назва мікроорганізму	День дослідження											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	кількість КУО/мл змива з 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.	≤ 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.	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	≤ 50	≤ 14	≤ 10
Bacillus cereus	≤ 50	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	≤ 70				
Aspergillus sp.		$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	≤ 70	≤ 30				

Результати дослідження мікробного пейзажу опікової рани у щурів I серії також показали, що на 10 добу експерименту у ньому відсутні стрептококи. На наш погляд, це пов'язано головним чином з антагоністичними властивостями стафілококів, яких вже на 7 добу експерименту було значно більше ніж стрептококів.

Сьогодні однією з актуальних проблем медицини є розвиток, у наслідок ряду причин, стійкості багатьох бактерій до антибіотиків. Саме тому, ми провели вивчення антибіотикограми виділених бактерій до 10 видів антибіотиків.

При проведенні статистичного аналізу чутливості стафілококів та стрептококів до антибіотиків диско-дифузійним методом, виявлений високий рівень резистентності цих бактерій до більшості антибактеріальних препаратів (таблиця 2).

Вивчивши грибову мікрофлору опікової рани, встановлено, що найбільша кількість ($\leq 10^4$ КУО/мл) грибів роду *Candida* була на 7 добу експерименту, паралельно з найбільшою кількістю стафілококів ($\leq 10^6$ КУО/мл). Як видно із

таблиці 3, виділені штами грибів роду *Candida*, від щурів I серії мали високу резистентність до ністатину (83%).

Таблиця 2

Доля резистентних мікроорганізмів у відношенні до загальної кількості проб від щурів I серії, які містять даний бактеріальний штамп (у%)

Мікроорганізм	Назва антибіотика / кількість резистентних штамів									
	Бензил-пеніцилін	Ампіцилін	Оксацилін	Карбеніцилін	Канаміцин	Еритроміцин	Олеандо-міцин	Тетрациклін	Гентаміцин	Лінко-міцин
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	14	34	6	45	55	61	56	70	48
<i>Streptococcus sp.</i>	25	37	9	12	8	6	12	53	41	13

Таблиця 3

Доля резистентних штамів грибів роду *Candida* у відношенні до загальної кількості проб, які містять даний штамп мікроорганізму (у%)

Мікроорганізм	Назва антимікотика / кількість резистентних штамів (%)				
	ністатин	амфотерицин В	клотримазол	кетоконазол	флуконазол
<i>Candida spp.</i>	83	3	31	25	20

Тож, як видно з експерименту, у патогенезі післяопікових ускладнень важлива роль належить ендогенній інфекції, яка формується під впливом ендогенних збудників – представників нормальної мікрофлори. Відомо, що дані ускладнення, які викликані умовно-патогенними мікроорганізмами, характеризуються тривалістю та тяжкістю перебігу. Це пов'язано у тому числі і з тим, що для такої мікрофлори характерна висока стійкість до розповсюджених антибіотиків, доказом цього є результати антибіотикограми. У цьому зв'язку, застосування адекватного місцевого лікування опіків визначає можливість зниження більшості ускладнень опікової хвороби.

Саме тому, для досліду були взяті щурі II серії (n=18), яким з 3 доби для місцевого лікування опікової рани використовували гель ацетат хітозану та III серія (n=18) – для таких тварин, з 3 доби для лікування опікової рани використовували гель хітозану з 0,5% вмістом метилурацилу та мірамістину.

Як впливає з матеріалів, наведених у таблиці 4, видовий склад мікрофлори опікової рани у щурів II та III серій був менш різноманітний. Серед грампозитивних бактерій переважав *Staphylococcus aureus*. Цей вид стафілококу був виявлений у всіх щурів цих груп, але вже після третього нанесення (на 5 добу) гелю ацетата хітозану,

кількість цих бактерій значно зменшилася (до 34 КУО/мл – у щурів II серії та до 10^2 КУО/мл – II серії), у порівнянні з контрольною групою.

Таблиця 4

**Кількісний та якісний склад мікрофлори опікової рани
у щурів II та III серій**

Назва мікроорганізму	II серія щурів							III серія щурів							
	День дослідження / кількість (КУО/мл)							День дослідження / кількість (КУО/мл)							
	3	4	5	6	7	8	9	3	4	5	6	7	8	9	10
Staphylococcus sp.	$3 \cdot 10^2$	$\leq 10^2$	34	15	9			$4 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	56	24	6	
Streptococcus sp.	$2 \cdot 10^2$	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							$4 \cdot 10^2$	$\leq 10^2$	52	5				

У загальній структурі мікрофлори опікової рани у щурів II та III серій представники роду *Streptococcus* були менш численними. На початку використання гелю ацетату хітозану чисельність цих бактерій зменшилася до $2 \cdot 10^2$ КУО/мл, після другого нанесення – до 63 КУО/мл, а після четвертого нанесення данні бактерії не виявлялися.

Аналізуючи результати бактеріологічного дослідження мікрофлори опікової рани щурів III серії слід відмітити, що кількість *Streptococcus spp.* вже після першого нанесення зменшилася до 33 КУО/мл, але повне зникнення цих бактерій було лише на 9 добу експерименту.

Дана обставина, очевидно, свідчить про те що, гель ацетату хітозану має більш виражені бактерицидні властивості у порівнянні з гелем хітозану з 0,5% вмістом метилурацилу та мірамістину.

Слід зауважити, що стафілококи та стрептококи, виділені від щурів II та III серій, проявляли менш виражені патогенні властивості. При чому, якщо перед початком застосування гелей на основі хітозану повним набором факторів патогенності (гемолітична, лецитіназна, плазмокоагулазна, ДНК-азна активність) володіли 70 - 85% виділених *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, то після застосування таких гелей кількість штамів, які володіли повним набором факторів патогенності складала менше 50%.

Вивчення грибкової мікрофлори у щурів II та III серій в процесі лікування показало, що вже однократна обробка запального вогнища зменшила кількість *Candida spp.* до 34 КУО/мл (II серія) та 58 КУО/мл (III серія).

Як, відомо, «критичним» рівнем для розвитку інфекційного процесу є 10^5 мікробних тіл на 1 грам тканини рани. Результати нашого дослідження довели, що значно менше обсіменіння опіковій рани досягається вже після першого нанесення гелю на основі хітозану.

Крім того, строки лікування опікових ран із застосуванням гелю ацетату хітозану скорочуються на 2 – 3 доби у порівнянні з лікуванням гелем хітозану з 0,5% вмістом метилурацилу та мірамістину.

Щоб з'ясувати причину таких результатів, ми вивчили чутливість мікроорганізмів, індекс постійності яких був $C \geq 34\%$: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* та *Candida spp.* до мірамістину методом серійних розведень (таблиця 5). Для даного дослідження використовували аптечний «Мірамістин» та суспензії мікроорганізмів із стандартною кількістю 10^4 КУО/мл.

Отже, як видно із таблиці 5, в умовах дослідів *in vitro* доведено, що мірамістин у концентрації 1% має більш виражену протимікробну дію щодо мікробів, які колонізували опікову рану щурів II та III серій, ніж той самий мірамістин, але в меншій концентрації. Можливо саме це, стало причиною різниці у результатах лікування гелем ацетат хітозану та гелем ацетат хітозану з 0,5% мірамістину та метілрацилу.

Таблиця 5

Доля резистентних штамів мікроорганізмів ($C \geq 34\%$) до мірамістину виділених від щурів II та III груп (у%)

Назва мікроорганізму	Концентрація мірамістину у середовищі (%)			
	0,2	0,3	0,5	1,0
	Кількість резистентних штамів (%)			
<i>Staphylococcus spp</i>	48	33	22	15
<i>Streptococcus spp.</i>	34	25	12	6
<i>Candida spp.</i>	61	52	19	6

Відповідно до задач дослідження, нами була вивчена чутливість (*in vitro*) клінічних штамів мікроорганізмів, які найчастіше можуть спричиняти післяопікові ускладнення, до ацетату хітозану, ацетату хітозану з 0,5% мірамістіном та метілурацилом та антибіотиків, які широко використовуються в медичній практиці. Результати дослідження подані в таблиці 6.

Таблиця 6

Чутливість клінічних штамів мікроорганізмів до антибіотиків та гелів на основі хітозану

Найменування препарату	Кількість чутливих штамів, %					
	S. aureus (n=23)	S. epidermidis (n=20)	S. saprophyticus (n=20)	S. pyogenes (n=20)	S. faecalis (n=20)	P. vulgaris (n=10)
Бензилпеніцилін	52,2	45,0	10,0	55,0	20,0	20,0
Ампіцилін	47,8	50,0	50,0	95,0	40,0	30,0
Оксацилін	60,9	55,0	95,0	80,0	40,0	60,0
Карбеніцилін	34,8	55,0	0	50,0	25,0	30,0
Канаміцин	65,2	75,0	25,0	45,0	30,0	20,0
Еритроміцин	73,9	80,0	100,0	40,0	40,0	30,0
Олеандоміцин	60,9	65,0	55,0	10,0	20,0	30,0
Тетрациклін	52,2	70,0	0	0	0	10,0
Гентаміцин	65,2	75,0	100,0	100,0	85,0	90,0
Лінкоміцин	73,9	70,0	45,0	95,0	35,0	70,0
Ацетат хітозану	95,7	95,0	100,0	75,0	85,0	60,0
Ацетат хітозану з 0,5% мірамістіна та метілурацила	87,0	85,0	100,0	75,0	75,0	50,0

Як випливає з матеріалів, наведених у таблиці 6, чутливість патогенів гнійно-септичних процесів опікових ран до антибіотиків залежала як від типу останніх, так і від виду збудників.

З числа значимих патогенів всі штами мікроорганізмів проявляли високу чутливість до ацетату хітозану. Найменшу чутливість до ацетату хітозану з 0,5% мірамістіну та метілурацилу проявляли штами *E. aerogenes* (40,0% чутливих штамів), *P. vulgaris* та *M. morgani* (50,0% чутливих штамів), *K. pneumoniae* (55,0% чутливих штамів).

ВИСНОВКИ

1. Раньові покриття, що утворюються в результаті висихання гелю ацетат хітозану характеризуються наявністю мікропор, які здатні затримати макромолекули та запобігти втраті альбуміну з поверхні рани. В той же час покриття володіють значними сорбційними властивостями щодо раневого ексудату та високою швидкістю біодеградації. Вищевказані властивості більше виражені у чистого покриття в порівнянні з матеріалом з додаванням метил урацилу та мірамістину.
2. Отримані результати дослідження (*in vitro*) чутливості клінічних штамів бактерій до антибіотиків та ацетату хітозану свідчать про виражену антибактеріальну дію речовини. Спектр антибактеріальної дії ацетату хітозану, який включає різноманітні грампозитивні та грамнегативні бактерії, ефективність, що не поступається, а інколи і перевищує таку у гентаміцину та лінкоміцину, вказують на перспективність розробки на основі цієї речовини нового ряду протибактеріальних препаратів місцевої дії.
3. Місцеве використання гелю з ацетату хітозану та ацетату хітозану з 0,5% мірамістином та метилурацилом у терапії опікової рани щурів скорочує тривалість гнійно-запального процесу, що спричиняють умовно-патогенні мікроорганізми, які після використання таких гелей мають менш виражені патогенні властивості. Шляхом постановки експерименту на лабораторних щурах встановлено, що гель ацетату хітозану має фунгістатичну дію, про що свідчить виявлення, протягом експерименту) стабільної кількості *Candida spp.* у мікрофлорі 10% щурів II серії та 9% щурів III серії.
4. Дослідження біоптатів шкіри показало прискорення утворення грануляційної тканини на перших строках спостереження та зменшення утворення грубоволокнистої сполучної тканини в останній термін загоєння шкіри. Використання селективних покриттів зменшує запальні процеси на набряк тканин шкіри і прискорює епітелізацію раньової поверхні.

Список використаної літератури

1. Бодун Р.Д. На пути к созданию живого дермального эквивалента / Р.Д. Бодун, Н.В. Островский, А.Б. Шиповская, Р.К. Чернова, И.Б. Белянина, Д.С. Моисеенко // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2008. - №1. – С.37-38.
2. Бузинова Д.А. Сорбционные и бактерицидные свойства пленок хитозана / А.Д. Бузинова, А.Б. Шиповская / Известия Саратовского университета. – 2008. – Т.8, вып. 2. – 42-46.
3. Веселов А.Э. Опыт использования раневых покрытий «Воскопран®», «Парапран®», «Воскосорб®», «Гелепран®» в комплексном лечении детей с ожоговой травмой [Электронный ресурс] / А.Э. Веселов / Медицинская сестра. – 2008.- №3. –С.33. -Режим доступа : www.voskopran.ru
4. Галатенко Н.Л. Створення перев'язного плівкового засобу з широким спектром дії для лікування ран та опіків / Н.Л. Галатенко / Клінічна терапія. – 2006. - №11-12 – С.52.
5. Гальбрайх Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л.С. Гальбрайх // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т.7, №1. - С.51-56.
6. Г.А. Вихревой, В.П. Варламова, Винник Ю.С., Большаков И.Н., Карапетян Г.Э. Аскорбат хитозана в мембранном диализе гнойных ран. Современные перспективы в исследованиях хитина и хитозана - «Наука». – М. – 2006. – С.7-23.
7. Глянцев С. П. Лечение гнойных ран повязками с иммобилизованными ферментами протеолиза: проблемы и перспективы / Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С.100-102.
8. Дадашев А. И., Толстых Г. П., Дербенев В. А. Антиоксидантные покрытия при лечении ожоговых ран // Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 147-148.
9. Ефименко Н.А. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран / Н.А. Ефименко, Ф.Е. Шин, М.П. Толстых, А.С. Тепляшин / Военно-медицинский журнал. – 2002. - №1. – С. 48-52.
10. Еулай П. И. Биологические комплексы для заживления ожогов // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств: Мат. междунар. конф.- М., 1995.- С. 116-117.

11. Каем Р. И. Ожоги.- Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В. В. Серова, В. С. Пауков.- М.: Медицина, 1995.- С. 457-468.
12. Калинина Т. Н., Хохлова В. А., Чуфаровская Т. И. и др. перевязочные средства на основе хитозана // Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 123-124.
13. Калсонов А.В. Комбинированные химико-терапевтические средства и коллагеносодержащие раневые покрытия с антимикробным действием в местном лечении пациентов с ранами и раневой инфекцией / А.В. Калсонов // Анналы хирургии. – 2002. - №4. -С.64-67.
14. Кацадзе М. А., Мирошниченко А. Г., Хрипунов А. К. и др. Применение гидрогелевой повязки "Бакцеласепт" в лечении гнойно-некротического панкреатита и послеоперационных гнойных ран//Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 140-141.
15. Кильдеева Н.Р. Новый подход к созданию материалов с контролируемым выделением лекарственных веществ / Н.Р. Кильдеева, В.Г. Бабак, Г.А. Вихорева, Е.П. Агеев, М.А. Голуб, Л.С. Гольбрайх, Е.А. Маркович // Вестник Московского университета.- Серия 2: химия. – 2000. - Т.41, № 6.
16. Ковешенко Ю.Н. Кожа человека.- М.: Медицина, 2006.- 360 с.
17. Матасов В. М., Голованова П. М., Бероева В. К. Раневые покрытия Альгикол АК и Альгикол АКФ в местном лечении длительно незаживающих ран и трофических язв // Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 128-129.
18. Мяделец О.Д., Адашкевич В.П. Морфофункциональная дерматология.- М.: Медицина, 2006.-752 с.
19. Мулюкина М. В., Моисеева А. А., Табаргук Л. Д. и др. Создание самоклеющихся лечебных повязок/ Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 37-38.
20. Парамонов Б.А. Новые раневые покрытия в лечении ожогов и ранений / Б.А. Парамонов, В.О. Сидельников, С.Н. Татарин, В.А. Иванцов, Л.М. Капитонов, В.И. Емельянов, О.В. Лукашов, М.М. Муталибов, А.К. Дзуцев, В.В. Панов / Военно-медицинский журнал. – 2002. - №4. – С.70-73.
21. Пат. 2278188 Российская Федерация, МПК7 С1. Способ получения хитозансодержащего волокна / Кириленко Ю.К., Нагапетян Р.А.; заявитель и

патентообладатель ООО “Инвест-Фарм” – № 2004132747/04 ; заявл. 11.11.2004 ; опубл. 20.06.2006, Бюл. № 17.

22. Полевое В. Н., Добыш С. В., Кшшмгук Л. Е. и др. Формирование повязок на раневой поверхности - новое направление в местном лечении ран / Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 40-41.
23. Пономарев А. Ю., Черкасов В. А., Болотова М. Ф. и др. Изучение эффективности угольных сорбционных повязок для санирования гнойных ран // Междунар. конф. "Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов".- Москва, 1995.- С. 64.
24. Проведение клинических испытаний раневых покрытий «Коллахит» (Отчет, Институт хирургии им. В.Г. Вишневского РАМН, Москва, 1996) [Электронный ресурс] – Режим доступа : www.kollahit.ru.
25. Сливкин А.И. Синтез лекарственных аналогов хитозана / А.И Сливкин, В.Л. Лапенко, А.А. Болгов / Вестник ВГУ. - Серия: химия, биология, фармация. - 2005 - №2. - С.205-208.
26. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение:[Под ред. Скрыбина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П.]. - М.: Наука, 2002.-365 с.
27. Хупафин С.Н. Модифицированные пленочные покрытия на основе хитозана для временной защиты ожоговых ран / С.Н. Хупафин, С.В. Колесов, Р.М. Зинатуллин // Скорая медицинская помощь. – 2006. -Т.7, №3 - С.134-135.
28. Amaral I.F. Functionalization of chitosan membranes through phosphorylation: atomic force microscopy, wettability, and cytotoxicity studies / I.F. Amaral, P.L. Granja, Luis V. Melo, B. Saramago, M.A. Barbosa // Journal of Applied Polymer Science. – 2006. – V. 102 – P. 276-284.
29. Anand Babu Dhanikula Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel [Электронный ресурс] / Anand Babu Dhanikula, Ramesh Panchagnula // The AAPS journal. – 2004.- V. 3, №6. – P. 27-32.
30. Chandra W. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review / W. P. Chandra, P.Sharma // Trends Biomater. Artif. Organs. – 2004.-V.18, № 1. - P.18-23
31. Chilarshi A. Novel dressing materials accelerating wound healing made from dibutyrylation / A. Chilarshi, L. Szosland, I. Krucińska, P. Kiekens, A. Błańska, G. Schoukens, R. Cisło, J. Szuniewicz // Fibres&Textiles in Eastern Europe. – 2007. - V.15, №4 (63) - P.77-81.

32. Ciechanska D. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications / *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. – 2004. - V.12, №4(48) - P.69-78.
33. 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. – V. 18. – P.117-131.
34. Hadjiiski O., Anatasov N. Amniotic membranes for temporary burn coverage // *Annals of burns and fire disasters*.- 1996.- Vol. 9, № 2.- P. 88-93.
35. Hyunmin Yi Biofabrication with chitosan / Hyunmin Yi, Li-Qun Wu, William E. Bentley, Reza Ghodssi, Gary W. Rubloff, James N. Culver, Gregory F. Payne // *Biomacromolecules*. – 2005. – V. 6, № 6 – P.2881-2894.
36. Jayakumar R. Preparative methods of phosphorylated chitin and chitosan – an overview / R.Jayakumar, Selvamurugan N., S.V. Nair, S. Tokura, H. Tamura // *International journal of biological macromolecules* – 2008. – V. 43. –P. 221-225.
37. Kalinkevich O. Development and characterization of low-cost medical composite materials based of fungal mycelium chitosan and calcium phosphate // *Укр. Біохім. Журн.* – 2009.- Т.81. - № 4 (спеціальний випуск- VII Parnas conference of biochemistry and molecular biology) – С. 298.
38. Kalinkevich O.V., Sklyar A.M., Danilchenko S.N., Kindya V.I., Kalinkevich A.N., Sukhodub L.F. Production of composite biomaterials for medical application on the basis of chitosan from *Blakeslea trispora* industrial waste // *Journal of biotechnology*. – 2008. – V. 136S – P. 448.
39. Niekraszewicz A. Chitosan medical dressings / A.Niekraszewicz // *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. – 2005. - V.13, №6(54) - P.16-18.
40. Petrulite S. Advanced textile materials and biopolymers in wound management / S. Petrilite / *Danish medical bulletin* – 2008. - V. 55. - №1. - P.72-77.
41. Ratajska M. Studies on the biodegradation of chitosan in an aqueous medium / M. Ratajska, G. Strobin, M. Wiśniewska-Wrona, D. Ciechańska, H. Struszczyk, S. Boryniec, D. Biniś, W. Biniś // *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. - 2003. - V.11, № 3(42) - P.75-79
42. Silva C.C. On the piezoelectricity of collagen-chitosan films / Silva C.C., Lima C.G., Pinheiro A.G., Goes J.C., Figueiro S.D., Sombra A.S.B. // *Phys.Chem.Chem.Phys.* – 2001. –V. 3. - P.4154-4157.
43. The Global Market for Advanced Wound Care Products 2008. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <http://www.researchandmarkets.com/reports/604698/>
44. Yudanova T. Modern wound dressings: making and properties / T. Yudanova, I. Reshetov / *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2006. – V. 4, №8. – P. 430-434.