ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Орлова Ольга Владимировна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН

3.1.9. Хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Жариков Андрей Николаевич

Барнаул – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…… 5

ГЛАВА 1 СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ В МЕДИЦИНЕ И ХИРУРГИИ РАНЕВЫХ ПРОЦЕССОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) …..... 14

1.1 Распространенность, механизмы повреждения, летальность, классификация ожогов кожи и мягких тканей..... 14

1.2 Современные методы лечения ожоговых ран……..... 20

1.3 Свойства и безопасность материалов на основе бактериальной целлюлозы……..... 27

1.4 Медицинские приложения бактериальной целлюлозы……..... 32

1.5 Применение раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы в лечении ожоговых ран…… 36

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ…….. 39

2.1 Синтез, структура, свойства применяемых в исследовании образцов бактериальной целлюлозы……..... 39

2.2 Дизайн экспериментальных исследований……..... 41

2.3 Экспериментальная оценка безопасности бактериальной целлюлозы (острая токсичность и цитотоксичность)…….. 43

2.4 Экспериментальное исследование применения бактериальной целлюлозы в качестве раневого покрытия при лечении ожоговых ран…… 47

2.5 Патоморфологические и морфометрические исследования……..... 52

2.6 Статистическая обработка полученных результатов……..... 53

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ……...…… 54

3.1 Исследование острой токсичности бактериальной целлюлозы при накожном применении……... 54
3.2 Патоморфологическое исследование внутренних органов крыс при применении бактериальной целлюлозы …….……. 57
3.2.1 Патоморфологическая характеристика печени ……... 57
3.2.2 Патоморфологическая характеристика миокарда… 58
3.2.3 Патоморфологическая характеристика легких…… 59
3.2.4 Патоморфологическая характеристика почечной ткани……. 60
3.3 Исследование цитотоксичности экстракта бактериальной целлюлозы при контакте с дермальными фибробластами человека.. 61
ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОЖОГОВЫХ РАН……..... 65
4.1 Изменения площади и микробного спектра ожоговых ран при лечении с помощью раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы в эксперименте…… 65
4.2 Патоморфологические изменения ожоговых ран при использовании различных раневых покрытий……. 74
4.2.1 Патоморфологические изменения ожоговых ран в контрольной группе на 3 и 28 сутки…… 75
4.2.2 Патоморфологические изменения ожоговых ран группы с использованием бактериальной целлюлозы (физиологический раствор) на 5, 10, 20, 28 сутки …… 76
4.2.3 Патоморфологические изменения ожоговых ран в группе с использованием бактериальной целлюлозы (1% хлоргексидин) на 5, 10, 20, 28 сутки…… 81
4.2.4 Патоморфологические изменения ожоговых ран в группе с использованием в лечении мази Левомеколь на 5, 10, 20, 28 сутки.... 86

4.3 Динамика лабораторных показателей крови при лечении экспериментальных ожоговых ран с помощью раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы……..... 102

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..... 111

ВЫВОДЫ……... 121

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ……... 123

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ…… 124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ…….. 125

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…….. 126

ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) Патент РФ № 2815760 Способ создания глубокого ожога у крыс в эксперименте……..……. 144

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Лечение ожоговых повреждений кожи остается одной из значимых проблем хирургии повреждений [5, 14]. Несмотря на достигнутые успехи в комбустиологии летальность в России варьирует от 3,9 до 5,7%. В настоящее время при наличие пограничных термических ожогов кожи II, III степени широко используется местное лечение с применением разнообразных перевязочных материалов, которые позволяют ускорить заживление ожоговой раны, уменьшить длительность лечения и профилактировать постожоговые осложнения [7, 8]. Исследователи и клиницисты, наряду с известными методами (ауто- и аллодермопластика) и материалами (гидрогели, композиционные препараты и др.), для лечения ожоговых ран все чаще обращают внимание на субстанции природного (биологического) происхождения, большая часть из которых может быть с успехом использована для стимуляции процессов репарации и регенерации. Несмотря использование активной хирургической тактики, наличие современных антисептиков и композиционных перевязочных средств, которые применяются в специализированных ожоговых отделениях по-прежнему остаются проблемы хирургического лечением пациентов с термической травмой. Остается высоким лизис аутодермотрансплантатов, частота которых достигает 32% случаев. Более чем в 70% наблюдений случается нагноение ран донорских участков кожи. Все это приводит к отрицательным результатам лечения, низкому реабилитационному потенциалу реконвалесцентов, а также к высокой летальности среди пациентов с глубокими и обширными ожогами варьирующей от 13 до 15%.

Одной из эффективных технологий лечения ожогов кожи является создание над раневой поверхностью закрытой влажной среды, что позволяет создать механический барьер, уменьшить количество перевязок и добиться более быстрого заживления раневого дефекта.

Существует много причин, по которым бактериальная целлюлоза (БЦ) является наиболее предпочтительным кандидатом для разработки новых перевязочных материалов и средств для лечения ран. Она не обладает токсичностью и для нее характерны высокая механическая прочность, совместимость с другими материалами, а также пластичность, биоразлагаемость, водоудерживающая способность [73, 111].

Широко известно применение БЦ в промышленной сфере, так, например, в качестве упаковки для пищевых наборов, в виде составных частей различных электронных приборов, в текстильном производстве и конечно в биомедицине [62]. Микрофибриллярная сетчатая 3D структура, с толщиной микрофибрилл от 30 до 250 нм позволяет соотнести ее к наноматериалам и это обеспечивает ей соответствующие уникальные свойства [43]. В отличие от растительной целлюлозы, целлюлоза на основе биополимера глюкозы и бактерий не содержит лигнина и других полисахаридов [154]. Наноструктурые свойства позволили применять целлюлозные материалы в качестве основы для создания различных медицинских изделий, перевязочных средств, других различных биомедицинских приложениях, включая формирование кровеносных сосудов в микрохирургии [83], замещение дефектов сонных артерий в сердечно-сосудистой хирургии, разработку сосудистых стентов, лечение трофических язв, в том числе при синдроме диабетической стопы, лечение ожогов [81, 86] и восстановления кожи, в качестве основы для формирования роговичной ткани, лечения одонтогенных заболеваний, восстановления костей носа, создание костных структур, замену хрящевой ткани уха [149], регенерацию поврежденных нервных волокон [161], замену твердой мозговой оболочки и т.д. В связи с этим, применение новых влажных биоматериалов для лечения ожогов кожи может стать перспективной технологией, которая может успешно применяться в хирургии и комбустиологии.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время стандартное лечение раневых дефектов кожи после ожогов включает в себя несколько важных моментов, которые способствуют заживлению раны и образованию в ней минимального количества рубцовой ткани. Это уменьшение экссудации из ожоговой раны, значительное увеличение которой наблюдается в этот период, что нарушает нормальный влагообмен кожи, а также защита раневой поверхности от микробной контаминации, препятствующей активации репаративных процессов в ране. В настоящее время термические дермальные повреждения кожи достаточно успешно лечатся с помощью трансплантатов кожи как самого больного, так и с использованием различных ксенотрансплантатов. В исследованиях установлено, что целлюлозные повязки особенно эффективны при ожоговых ранах с большой экссудацией и ранах на фоне высокой температуры [81, 86]. Из-за большого количества влаги они способны охладить область поражения и облегчить дискомфорт, вызываемый болевым синдромом. При свежих и неглубоких ожоговых ранах повязки на основе целлюлозы способствуют процессу эпителизации на основе формирования защитного механического барьера, тем самым снижая риск микробного обсеменения и потери жидкости. Биоцеллюлозные повязки также могут способствовать очищению раны от некрозов и фибрина, а также стимулировать ангиогенез при глубоких ожогах.

Таким образом, применение материала на основе БЦ, как нового медицинского биопродукта, является перспективным при лечении ран кожи и мягких тканей различного генеза, особенно ожоговых ран. Создание комфортной влажной среды для раны за счет поглощения раневого экссудата, предотвращение микробной контаминации возможно благодаря уникальным свойствам биоцеллюлозного материала. Кроме того, биопленки позволяют ране активно заживать, не фиксируясь на раневой поверхности, что позволяет избегать дополнительного повреждения образующихся новых регенераторных клеток. В этой связи целлюлоза становиться новым биопродуктом для создания

перевязочного материала на основе современных технологий, а исследование ее дополнительных возможностей в хирургии становиться актуальным.

Цель исследования

Экспериментально обосновать биомедицинскую технологию хирургического лечения глубоких ожоговых ран с помощью раневых биологических покрытий на основе бактериальной целлюлозы

Задачи исследования

1. В экспериментальных исследованиях, на основе проведения токсикологических испытаний, изучить безопасность образцов бактериальной целлюлозы, используемых в качестве кандидатов раневых биологических покрытий.
2. Разработать в эксперименте формирование глубокого ожога кожи и биомедицинскую технологию лечения ожоговых ран животных с помощью биологических покрытий на основе бактериальной целлюлозы.
3. Провести патоморфологический и морфометрический анализ регенерации глубоких ожоговых ран при использовании биологических покрытий на основе бактериальной целлюлозы в эксперименте и сравнить их заживление при использовании традиционных технологий.
4. Изучить эффективность заживления ожоговых ран биологическими покрытиями на основе целлюлозных структур с помощью клинико-лабораторных и микробиологических методов исследования.

Научная новизна исследования

В экспериментальных исследованиях доказана безопасность (отсутствие острой токсичности и цитотоксичности) влажной бактериальной целлюлозы при использовании ее в качестве накожного раневого покрытия у животных и при

контакте с дермальными фибробластами человека. Впервые разработан способ моделирования глубокого ожога кожи в эксперименте, максимально приближенный по механизму к ожоговой травме для дальнейшего изучения возможности местного лечения ожоговых ран с помощью основных методов, применяемых в комбустиологии, в том числе с помощью биологических покрытий на основе бактериальной целлюлозы. Стадии заживления ожоговых ран при использовании различных биологических повязок на основе бактериальной целлюлозы были изучены экспериментально с использованием клинических, микробиологических, лабораторных методов исследования. Впервые проведено патоморфологическое и морфометрическое исследование процесса эпителизации глубоких ожогов кожи в эксперименте в сроки от 5 до 28 суток в зависимости от применения биологических раневых повязок на основе целлюлозных структур, в сравнении с традиционным открытым лечением ожоговых ран. В ходе экспериментальных сравнительных исследований доказана высокая эффективность заживления ожоговых ран при использовании биологических материалов на основе бактериальной наноцеллюлозы за счет формирования закрытой среды, что способствует, наряду с уменьшением количества перевязок и травматизации раневой поверхности, снижению микробной контаминации, увеличению скорости эпителизации ран, улучшению основных клинических и лабораторных показателей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Безопасность накожного применения биопленок БЦ продемонстрирована в эксперименте на лабораторных животных, а также при контакте биоматериала с дермальными фибробластами человека в условиях «in vitro». Полученные данные впервые свидетельствуют об эффективности применения этого биологического материала в хирургии и комбустиологии. Патоморфологические изменения ожоговых ран, клинические, микробиологические и лабораторные исследования убедительно доказали высокую скорость заживления ожоговых ран в закрытой

среде при использовании биопокрытий на основе целлюлозных пленок при сравнении с открытым традиционным ведением. В эксперименте разработан новый способ формирования глубоких ожоговых ран. Установлено, что раневые покрытия на основе БЦ могут способствовать повышению эффективности оказания хирургической помощи в медицинских организациях 1,2,3 уровня при термических ожогах 2-3 степени. Полученная информация дает возможность обосновать клиническое применение БЦ в лечении ожоговых ран.

Методология и методы исследования

Научно-исследовательская работа проведена на кафедре госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (зав. кафедрой – д.м.н., доцент А.Н. Жариков). Период выполнения: 2023-2024 гг. Для достижения поставленной цели сформулированы задачи, определен двухэтапный дизайн проспективного исследования. Для решения первой задачи проведены экспериментальные токсикологические исследования безопасности раневых биологических покрытий на основе БЦ при накожном контакте с лабораторными животными и дермальными фибробластами человека.

Для решения второй задачи в экспериментальных условиях был разработан новый способ формирования глубокого ожога кожи и биомедицинская технология местного лечения ожоговых ран кожи животных с помощью биологических пленок на основе БЦ. Для решения третьей и четвертой задачи у экспериментальных животных с ожоговыми ранами проведены клинические, лабораторные, патоморфологические, морфометрические, бактериологические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. В экспериментальных исследованиях установлено, что биологические покрытия на основе бактериальной целлюлозы при накожном применении у

лабораторных животных не обладают острой токсичностью, а также не приводят к цитотоксическим изменениям при контакте с дермальными фибробластами человека in vitro.

2. Биологические покрытия на основе бактериальной целлюлозы в процессе высыхания образуют над ожоговой раной плотный струп, который является механическим барьером, препятствующим повреждению образующихся новых дермальных элементов на раневой поверхности, способствующим снижению ее экссудации, микробной контаминации, что в итоге позволяет уменьшить количество перевязок и ускорить заживление в 1,3 раза быстрее по сравнению с открытым ведением.

3. К 28 суткам лечения экспериментальных ожоговых ран в зарытой среде с использованием биологических покрытий на основе бактериальной целлюлозы у более 90% животных основных групп раны достигли окончательных патоморфологических критериев заживления (критерий 4), тогда как в группе сравнения это отмечено только у 60% особей, а при морфометрическом исследовании они отличались более эффективным уменьшением плотности воспалительного инфильтрата; меньшей выраженностью нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрации; более компактным расположением фибробластов, пучков коллагеновых волокон; преобладанием количества вновь образованных сосудов капиллярного типа.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность научных положений, результатов исследований и рекомендаций обусловлена дизайном исследования и достаточным количеством экспериментальных животных (n=100); современными клиническими, бактериологическими, патоморфологическими, морфометрическими, лабораторными методами; использованием соответствующих характеру распределения изучаемых признаков и величин методов статистического анализа. Основные положения и результаты исследования доложены на неделе науки в

ФГБУ ВО АГМУ Минздрава России (Барнаул, 2023, 2024), межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы абдоминальной, сосудистой хирургии и флебологии» (Барнаул, 2023), третьем Алтайском венозном форуме с международным участием (Барнаул, 2023), региональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной хирургии», посвященной 70-летию АГМУ (Барнаул, 2024).

Апробация результатов диссертации состоялась на расширенном заседании кафедр общей хирургии, оперативной хирургии и топографической анатомии; факультетской хирургии им. проф. И.И. Неймарка с курсом ДПО; госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул. Работа рассмотрена на заседании проблемной комиссии по хирургическим наукам ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России и рекомендована к защите. Материалы диссертации, ее выводы и рекомендации используются в учебном процессе кафедры госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России согласно учебно-методическим планам и программам подготовки студентов по специальности 31.05.01 «Лечебное дело», аспирантов и клинических ординаторов, обучающихся по программам подготовки кадров высшей квалификации по специальности 31.08.67 «Хирургия», а также включены в программы повышения квалификации циклов непрерывного образования хирургов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 1 патент на изобретение и 3 статьи в научных журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 1 из которых в индексируемой базе SCOPUS.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы. Текст проиллюстрирован 12 таблицами и 36 рисунками. Библиографический указатель содержит 170 литературных источников, из них 35 отечественных и 135 зарубежных публикации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Выполненная диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.1.9. Хирургия (медицинские науки), а результаты проведённого исследования – области исследования специальности, конкретно пункту 4 – «Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней и их внедрение в клиническую практику».

Личный вклад автора в выполнение исследования

Автор непосредственно участвовала в написании литературного обзора, разработке способа формирования глубокого ожога у крыс и апробации лечения экспериментальных ожоговых ран с помощью биопленок на основе БЦ, дизайна исследования, выборе методов исследования, в организации и проведении всех его этапов, в обработке экспериментального и статистического материала, анализе и интерпретации полученных данных, а также в подготовке публикаций по теме диссертации. Автор лично принимала участие в выполнении экспериментальных исследований по определению острой накожной токсичности и цитотоксичности бакцеллюлозы, в проведении более 65% перевязок ожоговых ран, в обследовании животных в последующем периоде. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых журналах, в патенте на изобретение и доложены на научных конференциях.

ГЛАВА 1

СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ В МЕДИЦИНЕ И ХИРУРГИИ РАНЕВЫХ ПРОЦЕССОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Распространенность, механизмы повреждения, летальность, классификация ожогов кожи и мягких тканей

Термическая травма остается одной из сложных проблем травматологии и продолжает занимать четвертое место по распространенности после дорожно-транспортных происшествий, падений и повреждений [5, 12, 19, 126]. Согласно данным ВОЗ за медицинской помощью по поводу ожогов в год обращается более от 5 до 6 миллионов пациентов, при этом частота ожогов кожи достигает 1:1000 человек в год. В настоящее время в Российской Федерации ежегодно регистрируется около 300 тысяч пациентов с термическими ожогами, 20% из которых нуждаются в стационарном лечении, остальные больные лечатся в амбулаторных условиях [14].

Несмотря на то, что за последние 10-15 лет в нашей стране наблюдается некоторое снижение числа ожоговых травм, как у взрослых, так и среди детей, количество ежегодных госпитализаций пациентов с ожогами, их последствиями и осложнениями за последние 3 года увеличилось, в том числе за счет взрослых пациентов с обширными ожогами [21]. Согласно статистике, в 2022 году в ожоговых отделениях лечебных учреждений России лечилось 39 993 пациента с ожогами и их последствиями, а общий уровень смертности составил в среднем 4,3%, из них у взрослых с ожогами - 6,9%, а уровень смертности у детей с ожогами - 0,2% [5].

Тяжелые ожоговые повреждения занимают ведущее место в структуре гибели военнослужащих, участвующих в современных вооруженных конфликтах [9] и являются одними из самых тяжелых видов боевой травмы [20]. От всего

количества повреждений, полученных в боевых условиях, частота ожогов варьирует от 2 до 5%. В 2022-2023 годах, в связи с проведением специальной военной операции, значительно возросло количество пострадавших военнослужащих в результате ожоговой травмы [21].

Классификация глубины ожогов (4 степени) разработанная А.А. Вишневским, М.И. Шрайвером используется в России на протяжении многих лет начиная с 60-х годов [2]. Ожоги первой степени являются поверхностными, так как затрагивают только эпидермис, наружный слой кожи, и характеризуются эритемой с небольшим отеком кожи. При ожогах второй степени в основном поражаются эпидермис и папиллярная дерма, которая является частью нижележащего слоя кожи. Место ожога, как правило, эритематозное с отеком, и в этих местах часто образуются волдыри, содержащие серозную и серозно-геморрагическую жидкость.

Ожоги первой и второй степени называют поверхностными, так как в них сохраняются эпителиальные клетки, и кожные покровы в таких случаях могут восстановиться самостоятельно. При ожогах IIIА степени повреждение уже доходит до сетчатого (росткового) слоя дермы, но при этом большая часть структур придатков кожи (потовые и сальные железы, фолликулы) может быть неповрежденной, в результате чего может быть быстрое восстановление и эпителизация раневого дефекта, а риск рубцевания низким. По данным Алексеева А.А. (1999) в ряде случаев, при большой вариабельности ожогов, придатки кожи препятствуют ее самостоятельному заживлению [3]. Если же ожог распространяется на более глубокие слои дермы, при большем повреждении придатков, регенерация эпителия будет проходить трудно, займет больше времени (3–6 недель) с высокой вероятностью образования гипертрофических рубцов, что нередко требует проведение аутодермопластики. В этой связи ожоги 3А степени называют пограничными [16]. Такие ожоги покрыты тонким коричневым струпом или большими волдырями с серозным содержимым желтого цвета

Глубокие ожоги кожи (3Б степень) характеризуются полным повреждением всей толщины кожи, а при 4 степени с переходом на подлежащие мягкие ткани (подкожно-жировая клетчатка, сухожильные элементы, мышцы, кости). При

ожогах 3Б степени на раневой поверхности образуется плотный струп серого или коричневого цвета, фиксированный к подлежащим структурам, а иногда можно отметить наличие больших пузырей с геморрагическим экссудатом, а при ожогах IV степени можно наблюдать плотную черного цвета корочку, глубоко фиксированную к подлежащим тканям. Ожоги 3Б – 4 степени являются глубокими и требуют хирургического вмешательства для обеспечения правильного заживления ран [4].

Как отмечают Алексеев А.А. с соавторами на пятом съезде комбустиологов Российской Федерации, который состоялся в 2017 году, на основе МКБ-10 была утверждена международная классификация глубины термической травмы. В соответствие с международными стандартами к клиническому применению рекомендована классификация ожогов по трем степеням. Согласно данной классификации эпидермальными или ожогами I степени принято считать ожоги I и II степени из предыдущей классификации, а к ожогам кожи II степени соотносятся соответственно ожоги IIIA степени. Ну и наконец, глубоким ожогам III степени соответствуют ожоги IIIБ и IV степени, при которых происходит повреждение всех слоев кожи и подлежащих структур мягких тканей.

Для определения площади ожогов в комбустиологии широко используется правило «девяток». Установлено, ладонь человека составляет 1% от поверхности его тела. Для определения доли поврежденной поверхности на теле человека принято выделять 11 сегментов по 9% каждый. В результате каждая верхняя конечность составляет по 9%, обе нижние конечности по 18% от всей площади тела, лицо и шея – 9%, передняя и задняя поверхность туловища по 18% и промежность – 1%. У детей используется модифицированное правило девяток с ошибкой не более 5% [33].

В течение длительного времени исследователи искали новый подход в предотвращении инфицирования ожогов, который позволил бы снизить контаминацию ожоговой раны и тем самым значительно улучшить и ускорить процесс заживления [8].

В течение многих лет ученые искали универсальные критерии материалов для лечения ожоговых ран, свойства которых способны не только упростить и улучшить заживление ран, но и также предотвратить распространение инфекции, отличающиеся доступностью и эффективностью [8]. Эту задачу решают с помощью моделирования различных по площади и глубине ожогов на животных и последующего использования новых повязок, материалов в лечении. Однако, практически невозможно создать идеальную экспериментальную модель ожога у животных в связи с особенностями анатомического строения тела различных видов. Действительно, у крыс труднее сформировать ожоговую рану большой площади с одинаковой глубиной повреждения тканей, чем у более крупных животных. Адмакин А.Л. и соавт. (2013) использовали в своем эксперименте медную пластину с круглой рабочей поверхностью диаметром 1,5 см, что соответствовало площади 2,25 $см^2$ [18]. Было обнаружено, что при среднем весе крысы 210±20 г площадь поверхности ее тела приближается к 250 $см^2$. Лучшей формулой, по которой рассчитывается площади кожи крыс является предложенная М. Ли в 1929 году формула S = 12,54xM0,66. В ней S указывает поверхность тела в $см^2$, а М на массу тела животного. Проведенные им исследованиям показали, что 427±26 см2 составила средняя площадь поверхности тела экспериментальных крыс, а 0,53% ожог поверхности тела животного наблюдался при однократной экспозиции нагретой пластины площадью 2,25 $см^2$. Постников Б.Н. в 1949 году предложил метод измерения площади ожога, который и сейчас широко применяется в ветеринарии. Прозрачная пленка накладывается на ожоговую поверхность и затем на ней очерчивают границы контура раневой поверхности. Сопоставив общую площадь поверхности тела животного и полученные размеры раны на пленке получают окончательные результаты площади ожоговой поверхности [17].

Восстановление нарушенной целостности тканей в результате термической травмы в процессе заживления ожоговой раны с является очень трудоемким процессом, который протекает длительное время и включает ряд последовательных стадий репарации, зачастую зависящих от состояния иммунной

системы [61]. По данным Kocik J. (1996) установлено, что: «для полного своего закрытия в ожоговой ране должны последовательно пройти ряд, идущих друг за другом, стадий: 1 стадия - воспаление, 2 стадия - пролиферация с образованием грануляционной ткани и 3 стадия - ремоделирование с возможным развитием рубца» [143]. Исследования показали, что базовую роль в заживлении ожоговых ран играет иммунная система пациента. Тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов основные биологические медиаторы воспаления (ИЛ – 1, ИЛ – 2, ИЛ – 4, ИЛ – 8, ИЛ – 10), а также элементы внеклеточного матрикса активируются посредством иммунной системы. При повреждении ткани мы видим автоматическое нарушение звеньев гомеостаза, напрямую связанных с накоплением жидкости, воспалением и развитием гипоксии [101].

Биопленка представляет собой структуру, образованную сообществом микробных клеток, и возникающие при этом инфекционные раневые осложнения у ожоговых больных увеличивают стоимость лечения, его продолжительность, а также существенно влияют на летальность. В работах Ward J. et al. (2018), Bahemia I.A. (2015) установлено, что при наличие общего тяжелого состояния ожоговых пациентов, контроль и управление раневой инфекций является одной из сложных задач, с которой сталкиваются врачи при лечении пациентов с глубокими и обширными ожогами кожи [118, 151].

Установлено, что кожа и ожоговые раны наиболее подвержены инфекционным осложнениям, особенно в течение первых 7 дней после термического воздействия [75, 126, 156]. Junaidi K. et al. (2019) установили высокую способность ожоговой раны к развитию раневой инфекции, с определением в раневых мазках до 95% положительных штаммов и колоний микроорганизмов [84]. Согласно последним научным исследованиям, посвященным осложнениям у ожоговых больных, наиболее частым осложнением из всей когорты является инфекция. Анализ изменений, происходящих на поверхности ожоговых ран, показывает высокую частоту вовлечения в раневой процесс грамотрицательных бактерий, а также контаминацию ран грамположительными кокками, больше выраженную на ранних стадиях. Для

хронических труднозаживающие ран характерна полимикробная этиология, где культуры содержат повышенное количество микрофлоры. Наряду с этим, бактерии могут образовывать или изменять структуры формирующихся биопленок. Быстрому росту бактерий может способствовать влажный раневой экссудат, особенно при развитии штаммов Enterobacteriaceae, которые могут проникать в более глубокие слои кожи. Инфекционные осложнения у пациентов с ожогами увеличивают стоимость и продолжительность лечения, а также смертность. Как отмечают Bahemia I.A. (2015), Ward J. et al. (2018), учитывая общее тяжелое состояние пациентов с ожоговой травмой, инфекционный контроль является одной из основных проблем, с которыми сталкиваются комбустиологи при лечении пациентов с глубокими дермальными повреждениями [118, 151]. Основываясь на образовании сложной матрицы внеклеточного полимера и возникая на глубоко пораженных некротических и покрытых детритом ожоговых поверхностях микробные биопленки вызывают явления, напоминающие парниковый эффект, благодаря которому под ними развиваются и размножаются различные штаммы микроорганизмов, отличающиеся высокой патогенностью. Было установлено, что вырабатываемая микробами бактериальная слизь защищает их от разрушительно воздействия иммунной системы, а также усиливает адгезию микробных клеток и некротических тканей [117]. Кроме всего она стимулирует выработку медиаторов воспаления (фактор некроза опухоли-α, интерлейкин-6) и активирует систему макрофагов.

Наличие этих условий позволяет патогенным микроорганизмам ожоговой раны выживать в присутствии антибиотиков широкого спектра действия, несмотря на концентрации, значительно превышающих стандартные дозы [117]. В этой связи для успешного лечения инфицированных ран необходимо местное применение антибиотиков и противогрибковых средств. По мнению Catanzano O. et al. (2021) и Farahani M. et al. (2021), естественные сигнальные молекулы, участвующие в процессе заживления, к которым относятся цитокины, компоненты внеклеточного матрикса и тканеспецифические факторы роста, могут быть использованы в качестве ингредиентов в ранозаживляющих материалах и современных

композитных повязках [85, 114]. Окислительный стресс является одним из сложных и главных патофизиологических механизмов термической травмы. Перфузия ишемизированных тканей после термического разрушения за счет переизбытка свободных радикалов приводит к дисбалансу между защитными системами организма, активными формами кислорода с понижением антиоксидантных свойств и барьеров.

Самой сложной задачей является лечение глубоких ожоговых повреждений, особенно в случае ожогов средней тяжести. В этих ситуациях часто затруднена первоначальная клиническая оценка степени ожога, что может в итоге привести к неправильной его классификации по площади и глубине поражения. При глубоких ожогах часто прибегают к активной хирургической тактике с целью ля удаления некротических и нежизнеспособных тканей для полного очищения раневой поверхности и подготовке ее к аутодермопластике. При глубоких и обширных ожогах и тяжелом общем состоянии больного консервативное лечение не совсем эффективно. Местное лечение ожоговых ран с использованием композиционных материалов может привести к успеху, однако идеальный перевязочный материал, имеющий различные компоненты и позволяющий полностью заживить раневой дефект без постоянного контроля за состоянием ожоговой раны, еще не разработан или не применяется повсеместно.

1.2 Современные методы лечения ожоговых ран

На протяжении первой половины 20 века лечение обожжённых пациентов представляло большие трудности. Гиперволемический шок, наблюдаемый в первые дни после термической травмы у большинства пациентов, был основной причиной смерти [160]. Вторая половине 20 века характеризуется улучшением результатов лечения в следствие появления и развития регенеративной медицины, совершенствования местного лечения ожогов, появления новых возможностей в фармакотерапии. Основой лечения больных с пограничными ожогами II-III степени основной является хирургическая тактика, которая позволяет улучшить

исходы ожоговой травмы и сократить время пребывания в стационаре. Принцип активной хирургической тактики в лечении глубоких ожогов требует наличия современных раневых повязок, как основного метода современной ожоговой науки, при этом аутодермопластика является основополагающей для устранения кожных дефектов. Во большинстве случаях надежное одномоментное закрытие обширных глубоких ожогов невозможно, а отсутствие донорских тканей и необходимость подготовки ожога к аутологичной дермопластике заставляют использовать повязки для временного закрытия. В комбустиологии постоянно ведутся дискуссии о местном лечении ожоговых ран, в частности рассматриваются сухие или влажных методы ведения [15, 30]. Ряд авторов в лечении добиваются образования сухого некротического струпа, который образуется в процессе высушивания ожоговых ран при применении открытого и полуоткрытого способа. Это достигается с помощью ежедневных перевязок с применением медицинского текстиля. Ведение ожоговых ран на основе сухого метода основано на соблюдении главного принципа, заключающегося в формировании на раневой поверхности сухого плотного струпа, препятствующего микробной контаминации и прогрессированию воспаления.

При пограничных ожогах IIIA степени часто рекомендуется начинать местное лечение с влажных повязок, которые постепенно могут подсыхать в течение суток. Это будет способствовать образованию тонкого струпа, состоящего из фибринозных наложений и некротических элементов поврежденной кожи. Доказано, что бетадин, йодинол, йодонат, хлоргексидин, димексид, входящие в антисептические повязки или левомеколь, левоцин, диоксиколь, являющиеся составными частями полиэтиленгликолевых водорастворимых мазей при открытом ведении ожоговой раны, наряду с физическими методами, могут способствовать формированию сухого струпа [1, 7, 25]. Местное лечение пограничных ожогов III А степени и более глубоких ожогов III подразумевает применение в большинстве случаев различных раневых материалов, и в том числе с успехом внедряется и гетерогенная ксенокожа. Предварительно перфорированная свиная кожа накладывается на ожоговую рану для обеспечения

ей покоя и защиты от инфекции, не мешая одновременному применению других препаратов для местного очищения раны. В настоящее время имеются публикации, где альтернативой открытому методу лечения противопоставляется местное лечение ожоговых ран во влажной среде. Во влажной среде, создаваемой в ожоговой ране, более качественно осуществляются межклеточные связи, улучшается доставка факторов роста, гормонов, продуктов, питательных веществ. На этом фоне улучшаются процессы образования цитокинов, внеклеточных структур, согласуются взаимодействия кожных и иммунокомпетентных клеток [42]. Есть мнение что влажная среда, используемая при лечении ожоговых ран, предотвращает высыхание тканей и помогает избежать углубления некротической зоны, что важно с точки зрения предотвращения деформации рубцов и образования контрактур в долгосрочной перспективе. Кроме того, влажная среда регулирует водный баланс в клетках кожи, подкожно-жировой и мышечной ткани и препятствует избыточному высыханию. Однако, сама по себе создаваемая в ожоговой ране влажная среда может способствовать контаминации, росту и развитию микроорганизмов и инфекции. В этой ситуации развитие вторичной инфекций может негативно сказаться на общем состоянии больного, продлевая сроки госпитализацию и снижая шансы на выздоровление.

Консервативное лечение ожогов, включающее использование влажных специализированных материалов, таких как гидрогелевые, гидроколлоидные и гидрофибровые повязки, а также с эффектом механической или ферментативной очистки, в настоящее время является общепринятым. Гидрогели представляют собой сравнительно новую группу перевязочных материалов. Индивидуальные свойства гидрогелей, такие как высокая адаптация к физиологической среде раны и мягким тканям, значительное содержание жидкости и воды, хорошая эластичность и конгруэнтность, делают их перспективным медицинским изделием для заживления ожоговых ран [106]. Применение этих материалов является перспективным, поскольку они, имея различные размеры и легкость к моделированию на раневой поверхности, могут быть наложены на разные части тела и достаточно эффективно закрыть ожоговую рану, а также охладить рану с

помощью конвекции и испарения [124]. Большинство этих перевязочных средств являются композитными, так как содержат обезболивающие, питательные и противовоспалительные вещества. Однако, большинство повязок после высыхания настолько плотно прилегают к ожоговым ранам, что их замена вызывает новое повреждение формирующегося эпителия, задерживает заживление и вызывает после перевязки у пациента болевой синдром. Несомненно, смена повязки занимает много времени (в основном более одного часа) и сопровождается часто отмачиванием материала от раневой поверхности, а потенциальный риск микробной контаминации в этот период окажет негативное влияние на дальнейший процесс заживления [55].

В ожоговой практике широко используется хитозан, продукт N-диацилирования хитина, доступный биоматериал, полученный из экзоскелетов насекомых, скелетов беспозвоночных и клеточных стенок грибов рода Mucoraceae [88]. По утверждению Mezzana P. (2008) такие свойства хитозана, как биосовместимость, биоразлагаемость, нетоксичность, с антигенными и антибактериальными свойствами позволяют считать его хорошим средством для местного лечения [150]. Хитозан может влиять на процессы регуляции гемостаза за счет связывания с эритроцитами, и эта способность его быстро подавлять кровоточивость значительно влияет на процесс регенерации и заживления ран. Кроме того, он оказывает стимулирующее влияние на образование грануляций на раневой поверхности и дальнейшее формирование клеток кожи за счет стимуляции процессов пролиферации фибробластов, постепенно преобразуя их из воспалительных клеток. Наконец, биоповязка на основе хитозана поддерживает стерильную среду для раневого экссудата, которая предотвращает возможное микробную контаминацию раны, тем самым создает условия для эффективного заживления.

В 21 веке для лечения ожогов начинает активно использоваться терапия ран с использованием отрицательно давления (NPWT) и вакуум-ассистированная раневая терапия (VAC). Оба метода основаны на механической компрессии ожоговой раны с помощью низкого давления. Установлено, что вакуум-терапия

применяется в зависимости от типа и поверхности ожоговой раны, наличия раневой инфекции, а также других факторов, влияющих на сложность процесса заживления. Механизм лечения основан на том, что присасывание на фоне отрицательного давления, создаваемого насосом, стимулирует механическое растяжение клеток, в конечном итоге активизирует пролиферативный процесс, что ускоряет заживление и эпителизацию раневой поверхности. На клиническую эффективность этого метода влияет усиление притока крови к раневой поверхности, стимуляция процессов ангиогенеза и синтеза коллагена уменьшение локального отека и снижение количества микрофлоры в ране.

Чтобы избежать таких распространенных осложнений, как сепсис, полиорганная недостаточность и острое повреждение почек, главным методом лечения глубоких и обширных ожогов кожи является раннее иссечение некротических тканей с последующим закрытием ран с помощью фрагментарных кожных трансплантатов [142]. Основными источниками этих покрытий являются собственная кожа больного, трупная кожа и кожа свиньи. В последнее время стали использовать бесклеточные ксенотрансплантаты кожи рыб, и в частности изготовленные из кожи атлантической трески рода Gadus morhua.

В научных работах 21-го века было показано, что в физиологические процессы эпителизации раневых поверхностей невозможны без участия в них стволовых клеток. Выделенные из костного мозга стволовые мезенхимальные клетки (СМК), способны переходить на раневую поверхность и дифференцироваться в кожные фибробласты на основных участках с 20% эффективностью [91]. Второй составной частью реэпителизации ран являются кератиноциты, которые образуются в результате дифференцировки эпидермальных стволовых клеток в межфолликулярном слое эпидермиса (в толще волосяных фолликулах). Терапия стволовыми клетками является базовым принципом регенеративной медицины и может быть использована для успешного заживления ожоговых ран с минимизацией процессов излишнего рубцевания [130]. Blanco F.G. et al. (2021) [120] было установлено, что «механизм действия СМК связан с паракринной функцией, высвобождением тканевых факторов роста,

внеклеточных везикул, цитокинов, которые играют важную роль в стимуляции ангиогенеза, миграции и пролиферации клеток кожи, регуляции воспаления» [121]. Стволовые клетки обычно выделяют из жировой ткани путем ферментативной деградации и центрифугирования для получения стромально-васкулярной фракции (СВФ) [59, 163]. Исследователи подчеркивают, что эта фракция в дополнение к 10-35% СМК содержит сильные иммуномодулирующие, ангиогенные и репаративные клетки, такие как перициты, гемопоэтические стволовые клетки, эндотелиальные клетки и цитокины [54, 93, 132].

Фармакологические, миниинвазивные или не инвазивные методы лечения зачастую бывают неэффективны или не дают значимого клинического результата, если имеются обширные ожоговых раны, занимающие более 25% поверхности тела. Таким пациентам рекомендуется поэтапная некрэктомия и трансплантация кожного лоскута [49]. Аутотрансплантаты являются наиболее подходящими для пересадки, поскольку риски иммунного отторжения минимален. Однако применение аутотрансплантатов у пациентов с очень обширными ожогами иногда ограничено, поэтому зачастую рассматриваются аллогенные кожные трансплантаты [107]. Некоторые авторы рекомендуют кожные трансплантаты, состоящие из эпидермиса и части дермы, разной толщины от 0,2 до 0,45 и более миллиметров [127]. Отмечается, что, при использовании аллогенных трансплантатов кожи всегда имеется высокий риск осложнений, включающий передачу различных заболеваний, а также отторжение кожного трансплантата [131]. Ряд исследований по разработке кожной ткани, направленные на биоконструирование искусственных кожных трансплантатов, показали, что возможно получение таких материалов со структурой, способной ликвидировать осложнения, возникающие при использовании аутотрансплантатов кожи и снижающей риск отторжения аллотрансплантатов [49, 131]. Совершенствование новых биоинженерных направлений заключается в создании материалов способных повышать регенерацию постожоговой раневой поверхности за счет насыщения раневого ложа кислородом, защищать рану от инфекции и поддерживать влажность, необходимую для микросреды раны [49, 131, 157]. Рядом

авторов отмечено, что «наиболее распространенными натуральными полимерами для пересадки кожи являются коллаген I или III типа, гиалуроновая кислота, хитозан и фибрин, а полиэтиленгликоль, силикон, гликолевая полимолочная кислота, полиуретан и полиглактин входят в список синтетических полимеров» [48, 60, 115, 119]. В настоящее время клеточные биотрансплантаты, засеянные дермальными клетками или бесклеточные трансплантаты являются основой для создания искусственной кожи. Полученные искусственным путем, трансплантаты могут напоминать различные слои кожи, что позволяет их подразделять на покрытия эпидермального, дермального или дермо-эпидермального направления [49, 131]. Авторы считают, что «заменители эпидермиса кожи изготавливаются из тонких мембран на основе биоматериалов с дополнительным засевом кератиноцитами, а аутологичные эпидермальные трансплантаты изготавливаются с использованием кератиноцитов больного. Кератиноциты получают из биопсий кожной ткани, при этом они набухают in vitro, образуя тонкие клеточные листы, имитирующие эпидермальные клетки [108].

Некоторым недостатком, которым обладает эпидермальная клеточная трансплантация является медленная пролиферация кератиноцитов вследствие значительного периода, который необходим для выращивания клеток [49]. Устранить этот момент и достигнуть более быстрой пролиферации кератиноцитов в условиях in vitro может совершенствование составных частей биоконструкций представленных в основном гиалуроновой кислотой, коллагеном, фибрином [122, 129]. После пересадки бесклеточные дермальные трансплантаты служат основой для миграции в нее эндогенных популяций фибробластов, что влияет на ускорение регенерации раневых дефектов [122]. Некоторые авторы сообщают, что совсем недавно были получены новые дермо-эпидермальные заменители кожи, которые имитируют оба слоя кожи дерму и эпидермис [19, 96, 152, 169]. Очень важной частью становиться механизм взаимодействия кератиноцитов и фибробластов. Наиболее адаптированными конструкторами кожи должны быть клеточные трансплантаты, содержащими оба типа клеток [122]. Новые технологии, применяемые для производства таких новых заменителей кожи, уже включают 3D-

биопринтинг [36] и электроспиннинг [154], а недавно было установлено, что мицелий может явиться основой для пролиферации фибробластов и кератиноцитов [47]. Значительное распространение при лечении ожоговых ран получают синтетические биополимеры, такие как БЦ, применение которой вызывает большой научный интерес.

1.3 Свойства и безопасность материалов на основе бактериальной целлюлозы

Все больше и больше исследователей начинают обращать внимание на БЦ, изучать ее, увеличиваются и связанные с этим достижения в сфере биотехнологий. В связи с этим были написаны соответствующие литературные обзоры, включающие все аспекты области применения БЦ в экономике, например, в биологической медицине, упаковке для пищевых продуктов, электронике, косметике, одежде и т.д. [62]. Количество исследований, посвященных использованию природных субстратов в составе перевязочных материалов для ран, медицинских изделиях и текстиле демонстрирует впечатляющий экспоненциальный рост [37, 38, 87, 141, 145, 162, 163, 167, 169, 170].

В биомедицинских целях биополимеры используются не только из соображений устойчивости, но в основном из-за их биосовместимости. Если материал вызывает адекватную или благоприятную реакцию организма, то считается биосовместимым. Однако, если это приводит возникновению некротических гранулем вследствие реакции на инородное тело, аллергии, инфекции материал классифицируется как не биосовместимый [46]. Свойства биосовместимости включают оценку цитотоксичности биоматериалов, разработанных in vitro, до экспериментов in vivo. Цитотоксичность можно упрощенно рассматривать, как влияние материала на живые клетки с точки зрения жизнеспособности, пролиферации, метаболизма, адгезии, изменений в морфологии, экспрессии ключевых метаболитов. Установленный порог приемлемой потери жизнеспособности составляет 30% [98]. При наличии

цитотоксичности изделие не вызовет адекватного или полезного ответа организма, а при отсутствии цитотоксичности, он с большей вероятностью вызовет соответствующую реакцию хозяина. Тем не менее, не цитотоксический материал может быть несовместим даже при наличии биосовместимости.

Материалы на основе БЦ в различных биомедицинских применениях отличает низкая генотоксичность и цитотоксичность [23, 45, 53, 103, 113]. Кроме того, гемосовместимость является ключевым параметром для медицинских применений, что определяется его склонностью к лизису эритроцитов, а также уровнем адсорбции коагулирующих агентов и других сигнальных молекул, которые взаимодействуют с путем активации комплемента. Отсутствие гемосовместимости быстро приводит к тяжелому иммунному ответу пациента. Гемосовместимость ex vivo в краткосрочном и долгосрочном ответе на имплантацию in vivo исследовали при влажной, лиофилизированной и высушенной БЦ с помощью определения гемолиза и времени свертывания крови [109]. Взаимодействие между эритроцитами и влажной БЦ уменьшалось за счет присутствия жидкости, снижая процент гемолиза до приемлемых значений.

БЦ по понятным причинам является одним из наиболее ведущим биополимерным субстратом для биомедицинских применений и медицинского текстиля, а также в других сферах промышленности из-за ее повсеместной доступности и замечательных свойств [31]. Сейчас нановолокна БЦ в основном синтезируются из бактерий [43] с накоплением во время инкубации сгенерированных фибрилл в трехмерной матрице. На их размер влияют штаммы бактерий, концентрация растворенного кислорода, тип культуры (статическая или динамическая), время инкубации, схема реактора, культуральная среда и другие параметры. Кристалличность БЦ значительно выше, чем у растительной целлюлозы. Размер волокон БЦ и их концентрация (которая влияет на размер пор) сильно варьируется: ширина от 10 до 100 нм и длина от 50 нм до 100 мкм [90]. Макроскопически БЦ можно рассматривать как трехмерный или двумерный материал. Влажная «губчатая» структура БЦ имеет макроскопический 3D вид. То же самое происходит в случае лиофилизированного БЦ или аэрогеля с «морозным»

внешним видом. Однако, если БЦ высушить, то из-за испарения воды, содержащейся в нанофибриллах БЦ, они будут разрушаться, образуя дополнительные водородные связи и становиться «бумажными». Свобода нанофибрилл перестраиваться резко снижается, что уменьшает ее способность к растяжению [74, 76, 139].

В отличие от своего растительного аналога, БЦ представляет собой чистый полимерный гидрогель без примесей лигнина [134, 166], волокна ее намного толще и имеют более низкую плотность водородных связей. БЦ более гидрофильна и обладает более замечательной способностью образовывать трехмерную разветвленную сеть плотно упакованных ультратонких волокон. Эта структура определяет многие полезные свойства, такие как высокая прочность на растяжение, отличные водоотталкивающие свойства. Материалы на основе БЦ показали биосовместимость при отсутствии или минимальной цитотоксичности и генотоксичности [23, 53, 103, 113]. БЦ обладает рядом замечательных физико-химических свойств, необходимых для лечения ран, таких как кристалличность, эластичность, прозрачность, высокая степень полимеризации, наноструктура, высокая чистота, механическая прочность и прочность на растяжение, пористость, биоразлагаемость, биосовместимость [52, 67, 71, 144, 159]. Кроме того, нативная БЦ способна абсорбировать раневой экссудат, обеспечивая при этом хорошее увлажнение раневого ложа и газообмен с окружающей средой. Некоторые из характеристик БЦ (пористость, химический состав поверхности и ориентация волокон) не являются идеальными для каждого применения, и иногда необходимо адаптировать БЦ для конкретного медицинского приложения [10]. Желаемые свойства БЦ могут быть дополнительно улучшены за счет синтеза его нанокомпозитов, посредством модификации БЦ [99]. Существует большое разнообразие вариантов, которые можно сгруппировать в два различных класса: модификации in situ и ex situ [89]. Полученные из клеток растений, животных или микроорганизмов природные биополимеры, к которым относятся желатин, хитозан, гиалуроновая кислота, крахмал, протеины широко используются для лечения ран, в том числе вследствие термических повреждений [73, 75, 92, 116]. В

качестве важного члена природного биополимера БЦ относится к полимеру глюкозы, секретируемому бактериями и линейно связанному Р-1,4-гликозидными связям. [154]. Кроме того, БЦ представляет собой экологически чистый материал с высокой удельной площадью поверхности сетчатая структура которой позволяет молекулам-гостям внедряться в его внутреннее пространство и создавать матрицу для лекарств [24]. В качестве лекарственного каркаса БЦ имеет широкий спектр преимуществ применения при лечении ран. Такие носители можно использовать во многих областях фармации, медицины и хирургии, от перевязочных материалов до внутренних или зубных имплантатов, которые доставляют обезболивающие, противовоспалительные препараты или бактериостатики в определенное место [27]. Эти носители могут применяться во многих областях фармакологии, медицины и хирургии – от повязок, доставляющих анальгетики, противовоспалительные и бактериостатические средства в нужные места, до внутренних и стоматологических имплантатов [27].

Новым применением перевязочного материала на основе БЦ является его использование у мужчин для лечения послеоперационных ран после операций на мочеполовой системе. Vilar F.D.O. et al. (2016) указал, что «у пациентов не наблюдались осложнения, связанные с применением препарата, такие как ишемия, инфекция или боль, что позволило сделать вывод о безопасности и эффективности перевязочных средств на основе БЦ» [44]. Известно, что вискозные повязки часто используются для лечения хронических язв венозной этиологии на нижних конечностях. В исследовании de Amorim J.D.P. et al. (2022) было показано, что по сравнению с вискозными повязками для ухода за ранами повязки из БЦ [64] превосходят их из-за низкой частоты смены повязок, минимального прямого контакта с раневой поверхностью, меньшего риска загрязнения и вторичного инфицирования, большей автономии пациента и меньшей фиксации повязки к ране. Meamar R. et al. (2021) показали, что более эффективное заживление ран диабетической стопы по сравнению с группой контроля было достигнуто при использовании пластин из БЦ, пропитанных венлафаксином и доксициклином [51].

Poonguzhali R. et al. (2017) приготовили биосовместимые композиты, включающие хитозан, поли(винилпирролидон) и БЦ. Были оценены толщина композита, барьерные, механические свойства, свойства проницаемости для водяного пара и кислорода. Установлено, что композит способен поддерживать адекватную влажную среду над раной. Кроме того, композит показал набухание, совместимость с кровью (менее 2% гемолиза) и умеренную антибактериальную активность в отношении золотистого стафилококка, синегнойной палочки. Цитотоксичность композита превышала допустимый порог в 70% при тестировании с использованием клеток нормальных эмбриональных фибробластов мыши [165].

Исследования нескольких лет показали, что для лечения раневой инфекции пластины БЦ используют в качестве матрицы для нанесения на них лекарственных препаратов с антибактериальной активностью [91, 153, 158]. Носители представляют собой гибриды иммобилизации лекарств и содержат фрагменты целлюлозных мембран и их композиты, целлюлозные шарики, а также целлюлозные волокна [65, 79, 120, 167]. Последние исследования в этой области Ciolacu D.E. et al. (2020), Inselman D.W. et al. (2021) ориентированы на разработку управляемых лекарственных систем, которые будут безвредны для организма, смогут вместить количество лекарственного средства, необходимое для достижения планируемых результатов лечения, а время высвобождения лекарств средств будет регулироваться различной продолжительностью лечения (от часов до дней) [91, 140]. Однако в опубликованных исследованиях Sulaeva I. et al. (2020) сообщается о различных проблемах, связанных с доставкой лекарств на основе БЦ [111]. Исследования N.H.C.S. Silva (2014), Cacicedo M.L. et al. (2020) показали, что в качестве носителя и в качестве повязки используется биологическая мембрана, поэтому лекарство в него доставляется замачиванием, что ограничивает возможность контролируемого отсроченного высвобождения действующего лекарственного вещества [68, 89].

Имеется много научных работ, где антибактериальные препараты, такие как амоксициллин, ципрофлоксацин, гентамицин или диоксидтитан, пероксид цинк,

серебро, являющиеся бактериостатическими препаратами, а также доксициклин, диклофенак, ибупрофен, венлафаксин, входящие в состав анальгетических противовоспалительных средств комбинируются с целлюлозными носителями или являются сложными композиционными материалами на их основе. Есть исследования по сочетанию с молекулами, такими как наночастицы серебра и другими химическими соединениями, например, глицерин, глютаровый альдегид, эвалуцин, рутин, низин [13, 51, 66, 68, 77, 95, 41, 120, 125]. Более крупные молекулы, такие как белки (например, альбумин, лизоцим, липаза или фосфолипаза) и факторы роста, должны быть адекватно иммобилизованы в целлюлозной мембране [79, 123]. Такие методы находят особое применение при разработке целлюлозных повязок и имплантатов, способствующих ангиогенезу и эпителизации. Многообещающие решения представлены в работах Ai F.-F. et al. (2020), Meamar R. et al. (2021), где носители БЦ стимулируют образование кровеносных сосудов с помощью фактора роста эндотелия сосудов или интерлейкина 4, повязки и имплантаты способствуют заживлению за счет ингибирования провоспалительных факторов (матрикс металлопротеиназы) [51, 110]. Наиболее передовые, хотя и относительно немногочисленные таргетные методы лечения с использованием БЦ применимы для лечения рака, где активным веществом обычно является доксорубицин [65, 104]. В этой области задача заключается в создании БЦ с реальной системой высвобождения. Поэтому необходима разработка новых, безопасных методов производства бактериальной целлюлозы (возможно, ферментативное окисление) и создание композитных материалов с магнитными, термическими и фоточувствительными свойствами [97, 166]. Такие исследования могут привести к созданию безвредных, функциональных и совместимых с современными методами лечения носителей.

1.4 Медицинские приложения бактериальной целлюлозы

БЦ используется в биомедицинских приложениях не менее 20 лет [146]. Как уже было сказано одним из наиболее важных ограничений БЦ является отсутствие

у нее антимикробной активности, что сильно ограничивает применение в качестве активной повязки на рану и в других областях хирургии с развитием инфекциям [78]. Однако в конкретных медицинских приложениях БЦ сама по себе по-прежнему обладает весьма важными функциями [6]. Кроме того, еще одной отличительной особенностью БЦ является ее макроскопическая форма, которая подстраивается под форму области, поэтому некоторые исследования были сосредоточены на разработке кондуитов БЦ для использования в качестве кровеносных сосудов или катетеров [63, 72].

Autier L. et al. (2019) разработали BNC-мембрану, которая использовалась в качестве каркаса для наложения на паренхиму головного мозга после резекции глиобластомы [39]. Благодаря высокой гибкости каркас из БЦ может быть легко введен в хирургическую резекционную полость глиобластомы. Кроме того, случайная волокнистая природа БЦ идеально подходит для улавливания опухолевых клеток, предотвращая их движение после прикрепления, что облегчает целенаправленное лечение и предотвращает рецидивы. Биосовместимость БЦ была показана отсутствием влияния на микроокружение головного мозга после имплантации мембраны БЦ в паренхиму головного мозга. Кроме того, через 12 месяцев клетки головного мозга присутствовали на мембране БЦ, что свидетельствует о отсутствии цитотоксичности БЦ по отношению к нормальным клеткам. В литературе имеются экспериментальные разработки использования БЦ в качестве материала для пластики твердой мозговой оболочки [32, 80]. Материал показал хорошие свойства биосовместимости, не вызывал иммунную и воспалительную реакцию, отсутствие нейротоксичности.

Ul-Islam M. et al. (2019) усилили свойства БЦ погружением в хитозан, который затем лиофилизировали для получения каркаса [102]. Взаимодействие клеток и каркаса анализировали с использованием клеточных линий рака яичников человека (A2780). Линии клеток рака яичников человека были обнаружены на поверхности и в глубине матрикса каркаса. Включение хитозана значительно повысило вероятность повышенной биосовместимости БЦ, способствуя клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировке.

Han Y. et al. (2020) использовали композиты БЦ и поливинилового спирта для создания тканевой инженерии стромы роговицы. Трансплантация роговицы является наиболее распространенным методом лечения серьезных заболеваний роговицы, хотя она ограничена из-за отсутствия доноров роговицы, которым была трансплантирована эта смесь. Результаты испытаний in vivo на кроликах не выявили негативных эффектов, таких как воспаление, а биосовместимость была хорошей [147]. Мембрана БЦ показала более высокую устойчивость к швам, чем амниотическая мембрана, предлагая хорошую прилегаемость к форме глаза. Никаких существенных изменений в диаметре или толщине, как было установлено визуальным наблюдением и измерениями поверхностной массы, обнаружено не было [76]. Zhang X. et al. (2019) изучали биосовместимость БЦ в качестве каркаса для замены стромы роговицы с использованием клеток эпителия роговицы и стромы кролика. Тесты in vitro показали почти 100% выживаемость, хорошую адгезию и пролиферацию эпителиальных и стромальных клеток на БЦ. Эксперименты in vivo подтвердили адекватную биосовместимость и стабильность БЦ в роговице кролика. Оптическая прозрачность БЦ сохранялась, и в течение 90 дней не было обнаружено явного отека или воспаления вокруг БЦ [50].

Трансплантаты из БЦ способствовали закрытию перфораций барабанной перепонки в оториноларингологии, где было продемонстрировано, что они являются инновационными, эффективными, безопасными, минимально инвазивными, эффективными материалами и имеют очень низкую стоимость [148]. Исследования Pang M. et al. (2020) свидетельствуют о том, что более плотная БЦ (спрессованность около 18%) является конкурентно способным скелетным материалом для реконструкции и регенерации хрящевой и костной ткани наружного уха. Материал соответствует упругими механическим свойствам человеческого хряща и может быть изготовлен по индивидуальной форме ушной раковины пациента [56]. В то же время работы Nimeskern L. et al. (2013), Исследования материала показали, что он демонстрирует отличную биосовместимость с хрящевыми и костными клетками in vivo и не препятствует процессу заживления [56, 149]. Было разработано несколько методов,

способствующих росту клеток в костных каркасах БЦ с регулированием размера пор и их взаимосвязей во время синтеза БЦ [57, 135], а также на этапе постпроизводства – с помощью лазерной абляции (лазерного паттернирования), 3D-печати или лиофилизации [149].

Композитные каркасы для костной ткани были изготовлены Noh Y.K. et al. (2019), содержащие в своем составе БЦ и коллаген [112]. Композит с самым высоким содержанием БЦ показал наиболее организованную взаимосвязанную пористую структуру с улучшенной физической стабильностью и водопоглощением. Регенеративную способность имплантатов БЦ оценивали с использованием стандартизированной модели штамповки бычьего хряща [137]. Хрящевые цилиндры-хозяева были получены из блока бедренной кости крупного рогатого скота с использованием стандартизированной перфорационной системы, в которую были вставлены имплантаты БЦ. При исследовании имплантатов БЦ наблюдалась прогрессирующая колонизация в сочетании с признаками миграции хондроцитов хряща хозяина. Такие результаты свидетельствовали о высокой цитосовместимости имплантата БЦ в текущей модели in vitro.

Несмотря на то, что существуют материалы «золотого стандарта» для изготовления сосудистых протезов большого и среднего диаметра, по-прежнему существует потребность в разработке сосудистых протезов малого диаметра (<6 мм), особенно с длительной проходимостью [40, 83, 94, 138]. Потенциал кондуитов БЦ кровеносных сосудов изучался Bao L. et al. (2021), где в качестве первого метода сосуды готовили путем помещения одной силиконовой трубки внутрь полой стеклянной трубки. Затем полость между ними заполняли культуральной средой, содержащей бактерии. Кондуиты БЦ обладали адекватной водопроницаемостью, процентом адгезии тромбоцитов, периодом рекальцификации плазмы и пролиферацией эндотелиальных клеток подвздошной артерии свиньи. Такие результаты предполагают лучший обмен питательных веществ, гемосовместимость и эндотелизацию после имплантации [133]. Weber C. et al. (2018) разработали BNC-слоистые трубки с уменьшенной толщиной стенок и гладкой поверхностью для небольших сосудистых трансплантатов, которые были

протестированы in vivo путем замены правой сонной артерии у овец. Результаты показали отсутствие расслоения в организме даже после нескольких месяцев имплантации, острых признаков реакции на инородное тело. Однако трубки были склонны к тромботической окклюзии, что требовало введения антитромбоцитарного препарата для снижения явлений окклюзии. Несмотря на медикаментозную терапию, проходимость увеличилась с 67% до 80% за 9 месяцев [164]. Возможность контролировать форму БЦ, изменяя ее во время культивирования или после очистки, расширила показания к применению этого материала в сосудистой хирургии и нейрохирургии, включая, в частности, протезы для реконструкции сосудов и каркасы трубки для регенерации периферических нервов [58, 70, 161].

1.5 Применение раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы в лечении ожоговых ран

Большинство исследовательских работ по оценке лечения ожоговых ран с помощью материалов на основе бактериальной целлюлозы в настоящее время являются экспериментальными [34]. Первые клинические испытания перевязочного материала из БЦ были проведены в Центре лечения ожоговых ран в Семяновице-Сленске, Польша [81, 86]. В своих исследованиях Czaja W. et al. (2004) отмечает, что: «оценка пригодности повязок для лечения ожоговых ран шла по трем основным направлениям: предотвращение потери жидкости из ожоговой раны, снижение микробной контаминации ожоговой раны и подготовка ее к аутодермопластике. Исследуемая группа состояла из 77 пациентов в возрасте от 18 до 70 лет с ожогами кожи I, IIA, IIБ и III степени, занимающими от 9 до 20 % общей поверхности тела. Более быстрое заживление проявлялось и более ранним изменением соотношения обилия грамотрицательных и грамположительных видов [86]. Большую эффективность повязки из целлюлозы показали при экссудативных ожогах и ожогах с высокой температурой. При наличие высокого содержания жидкости они способствовали охлаждению места ожога и тем самым снимали

болевой синдром, а при свежих, более поверхностных ожоговых ранах такие покрытия снижали инфицирование, уменьшали потери жидкости и способствовали удалению некротических тканей из раны при глубоких ожогах IIIB степени, повышая скорость эпителизации,

В качестве повязки на ожоговую рану БЦ может обеспечить влажную и мягкую среду для раны, что способствует заживлению раны [136]. В то же время ее нелегко приклеить к ране, но легко заменить [100]. Клинические исследования показывают, что благодаря своей эластичности и конгруэнтности повязки из БЦ особенно эффективны для лечения ожогов на более сложных анатомических участках тела (кисти, стопы, промежность, уши, лицо, суставы) [82]. Наряду с этим, сочетание повязки с антисептиками, включающими нитрат серебра, сульфат гидроксихинолина, борная кислота и др. оказывает положительное влияние на снижение инфекции в ожоговых и в других видах ран [26, 28, 29, 35, 86]. Клинические испытания Jankau et al. с использованием целлюлозных покрытий (Владиславово, Польша) в качестве повязки у больного с термическими ожогами показали очень хорошие клинические результаты [69]. По мнению Vilar F.D.O. et al. (2016), Emre Oz Y. et al. (2021) основным преимуществом этого материала является легкость получения больших по площади биологических мембран, покрывающих все тело и адаптирующихся к контурам конкретной области. Эти авторы также отмечают, что благодаря своим механическим свойствам этот материал поддерживает фазу регенерации кожной ткани за счет плотного прикрепления к ожоговой ране, стимуляции процесса пролиферации и дифференцировки клеток, с защитой ее от механического повреждения [41, 44]. В качестве повязки на ожоговые раны БЦ моделирует стерильную, удобную, защитную и достаточно влажную среду для чистых ожоговых ран, что ускоряет их заживление [105]. Кроме того, влажная БЦ хорошо поддается формованию, плотно прилегает к месту раны. Она более растяжима, однако он менее устойчив к разрыву, чем лиофилизированная БЦ [139]. Хорошие результаты показали повязки с БЦ для закрытия для донорского участка кожи при аутотрасплантации. В целом они были биосовместимы за счет легкого прикрепления к раневой поверхности и нахождения

на месте до тех пор, пока донорский участок под ней не эпителизируется. В последующем повязки легко отслаивались от эпителизированной кожи сама по себе [155]. Новые композитные повязки на основе БЦ с антибактериальным, антисептическим и ранозаживляющим действием привлекают всеобщее внимание при лечении ожоговых ран [22, 128]. Последние разработки по включению сульфатированных фукополисахаридов (фукоидана), содержащихся в бурых водорослях, в состав повязок на основе БЦ представляются перспективными. В экспериментальном исследовании Зиновьева Е.В. с соавт. (2019) 2% раствор фукоидана в повязках на основе БЦ толщиной от 0,5 до 1мм и 1 и 2 мм на 14 день показал снижение площади раны на 54% и 47% по сравнению с контролем [22]. В 2020 году ученые из Санкт-Петербурга предложили новый подход к улучшению свойств целлюлозной мембраны для применения в медицине. Чтобы сделать целлюлозу биоразлагаемой они использовали целлобиогидролазу. Наличие этого фермента в композиции для покрытия оказалось безопасным, что было подтверждено в исследованиях на животных. Раневые повязки, созданные на основе БЦ с целлобиогидролазой, оказали положительное влияние на лечение ожогов 3 степени и значительно ускорили процесс заживления [97]. В экспериментальном исследовании Черниговой С.В. с соавт. (2021) было установлено, что при местном лечении ожоговых ран БЦ-покрытия следует использовать на первой стадии раневого процесса, так как они могут адсорбировать и удалять экссудат. При контакте с раневой поверхностью нанопокрытия плотно прилегают к раневой поверхности, создавая оптимальные условия для заживления раны [34].

РЕЗЮМЕ

Таким образом, на основе научных исследований установлено перспективное направление в области местного лечения различных раневых процессов, в том числе лечения ожоговых ран, связанное с применением новых биотехнологий. Разработка биологических материалов на основе бактериальной целлюлозы является значимой частью для развития современной регенераторной медицины, а эффективность их внедрения нуждается в дополнительном изучении.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Синтез, структура, свойства применяемых в исследовании образцов бактериальной целлюлозы

Образцы гелевой пленки микробной целлюлозы, полученные в лаборатории биоконверсии ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск были использованы в качестве материала для экспериментальных раневых покрытий. Влажная пленка БК представляет собой биополимер глюкозы, влажная полимерная волокнистая наноструктура которого синтезирована путем химического гидролиза моносахаридов (Рисунок 1 а, б).

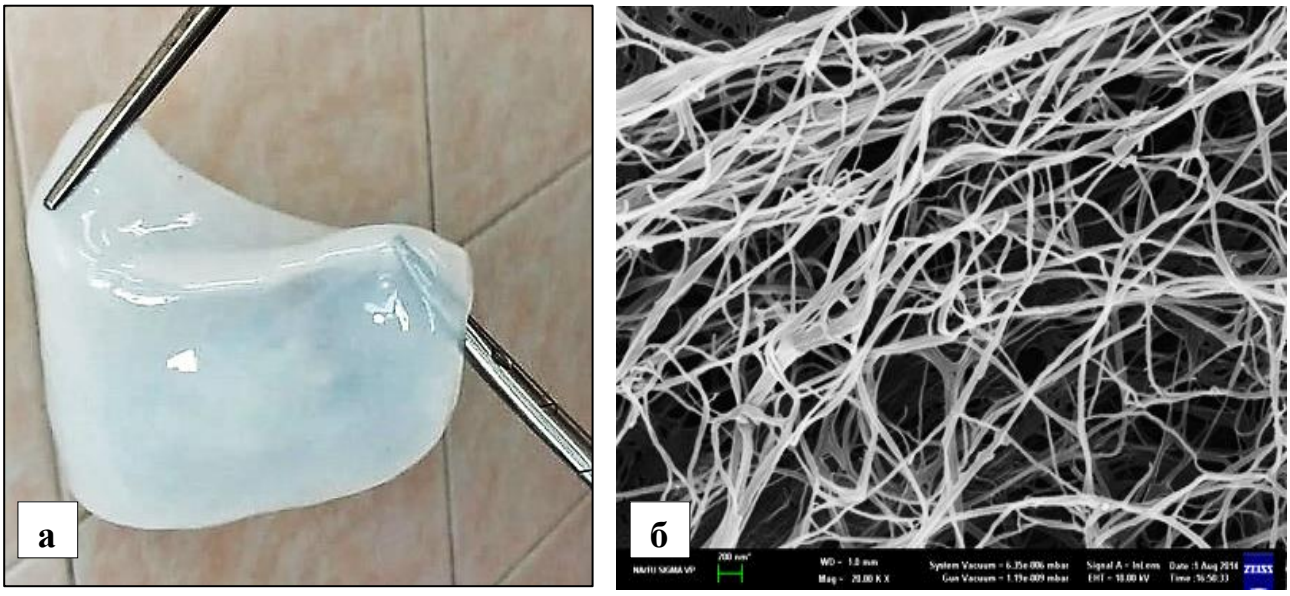


Рисунок 1 а, б – Фото влажной целлюлозной пленки (а), Электронная микроскопия: переплетение микрофибрилл в бактериальной целлюлозе (б)

Стерильные целлюлозные пластины, участвующие в экспериментальных исследованиях по лечению ожоговых ран, по своим химическим и физическим качествам представляли собой студневидные стерильные, гелеобразные пленки (Рисунок 1а), нерастворимые в воде, толщиной от 2 до 4 мм, прозрачного цвета,

хорошо растяжимые, имеющие нейтральную pH среду с содержанием до 99 граммов жидкости (вода) [23]. Матрица их была представлена микроскопическим переплетением множества микрофибрилл (Рисунок 1 б).

По данным Гладышевой Е.К. с соавт. (2015) для приготовления БЦ использовалась симбиотическая культура Medusomyces gisevii, которая состоит из 15-30 родов дрожжей и 8-10 родов уксуснокислых бактерий, известна также как Kombucha. Культивирование инокулята проводилось при температуре (27 ±0,2) °С в суховоздушном термостате в течение 7 суток. Для поддержания жизнеспособности гриба - продуцента и биосинтеза целлюлозной пленки использовали классическую для используемой культуры полусинтетическую питательную среду, состоящую из глюкозы и экстракта черного чая. При проведении химических технологий по созданию биоцеллюлозы авторы отмечают, что «суспензию сухого черного чая (10 г сухого черного чая на литр питательной среды, что соответствует содержанию экстрактивного вещества 3,2 г/л черного чая в среде) заливали кипятком, добавляли глюкозу из расчета 20 г/л, закрывали экстракционный сосуд крышкой, выдерживали содержимое при температуре 94-96°С в течение15 мин, затем с целью фильтрации просеивали через металлическое сито. Биосинтез БЦ проводился при температуре 27 °С в климатической камере (Binder-400, Germany) в статических условиях. Гель-пленка, образующаяся в результате биосинтеза, в процессе роста очищалась следующим способом: в течение двух суток образцы выдерживались в 2 %-ном растворе NaOH для удаления клеток, затем пленка промывались в дистиллированной воде до нейтральной реакции, далее обрабатывались в течение суток в 2 %-ном растворе HCl для удаления красящих веществ, затем пленка промывалась дистиллированной водой до нейтральной реакции среды. Методом ИК-спектроскопии установлена химическая чистота БЦ, где отмечено, что образцы не содержат примесей, характерных для растительной целлюлозы, вследствие отсутствия полос поглощения, указывающих на ароматические соединения. ИК-спектры образцов БЦ, полученных на синтетической питательной среде и среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО идентичны. Методом ЯМР-спектроскопии подтверждена

идентичность химического строения опытных образцов БЦ и растительной целлюлозы. Стерилизация материала достигалась автоклавированием при температуре 120^0С в течение 30 минут» [11].

2.2. Дизайн экспериментальных исследований

Всего в экспериментальных исследованиях было использовано 100 крыс типа Wistar (50/50 самки и самцы). Для достижения поставленной цели и выполнения установленных задач в ходе исследований было выделено 2 основных этапа. Выбор материала был обоснован оптимальными характеристиками БЦ, в частности, гидрофильностью, высокой эластичностью и растяжимостью, тонкостенностью и конгруэнтностью по отношению к подлежащим тканям, биосовместимостью.

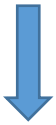
Все эксперименты на животных в данном исследовании проводились в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г., а также директивой Совета 86/609/EEC, основанной на тексте соглашения «Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments», и в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», утвержденными решением Совета Евразийской экономической комиссии № 81 от 03.11.2016.

Экспериментальные исследования проводилось согласно ГОСТа 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, 1986). Эвтаназия проводилась при соблюдении требований Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (г. Хельсинки, 2002) путем декапитации на лабораторной

гильотине после наркотизации диэтиловым эфиром с одновременным забором биологического материала для гистологического исследования.

План выполняемых экспериментов, ход работы, текущая документация и окончательный лабораторный протокол регулярно проверялись в процессе исследования. Проект экспериментальных исследований настоящей работы прошел биоэтическую экспертизу на заседании ЛЭК ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России (протокол № 6 от 26 апреля 2023г). Дизайн исследований представлен на рисунке 2.

<table>
<tr><td colspan="3">1 этап. Исследование токсичности и цитотоксичности БЦ в эксперименте (n=20)</td></tr>
<tr><td>Группа 1.
Контроль
(n=10), 14 суток</td><td>Группа 2.
Накожное нанесение
БЦ (n=10), 14 суток</td><td>Взаимодействие экстракта БЦ с дермальными фибробластами человека</td></tr>
<tr><td colspan="3">Оценка клинических, патоморфологических, лабораторных изменений</td></tr>
</table>



<table>
<tr><td colspan="4">2 этап. Исследование скорости заживления экспериментальных ожоговых ран с помощью раневых покрытий на основе БЦ (n=80)</td></tr>
<tr><td>Группа 1
Контроль
(n=20),
28 суток</td><td>Группа 2
Раневое покрытие БЦ с 0,9% раствором натрия хлорида (n=20), 28 суток</td><td>Группа 3
Раневое покрытие БЦ с 1% раствором хлоргексидина (n=20), 28 суток</td><td>Группа 4
Повязка с мазью Левомеколь
(n=20),
28 суток</td></tr>
<tr><td colspan="4">Оценка клинических, бактериологических, патоморфологических, морфометрических, лабораторных изменений</td></tr>
</table>

Рисунок 2 – Дизайн 1 и 2 этапов экспериментальных исследований

Выполнение первого этапа экспериментов подразумевало оценку безопасности целлюлозных гелеобразных плёнок, предлагаемых в качестве перевязочных средств для лечения ран после формирования глубоких ожогов кожи. На крысах линии Wistar была изучена острая токсичность при накожном

применении материала, также его взаимодействие с дермальными фибробластами человека с целью выявления возможной цитотоксичности.

На втором этапе проводилась оценка эффективности заживления экспериментальных ожоговых ран при использовании двух групп повязок на основе целлюлозных пластин (БК в физиологическом растворе и БК с адсорбцией 1% раствора хлоргексидина) по сравнению с обычными местными средствами лечения (группа сравнения) и контрольной группой животных. В ходе исследований проведена оценка клинических, бактериологических, патоморфологических, морфометрических, лабораторных изменений.

2.3 Экспериментальная оценка безопасности бактериальной целлюлозы (острая токсичность и цитотоксичность)

Исследование безопасности образцов наноцеллюлозы включало испытания на развитие у животных возможной острой накожной токсичности, в том числе оценку класса опасности, определялось согласно требованиям регламентирующих документов по проведению доклинических исследований. 20 аутбредных крыс породы Вистар обоего пола, массой животных от 300 до 350 граммов и в возрасте 4-5 месяцев явились объектами исследования. Групповое распределение осуществлялось с учетом того, чтобы индивидуальная масса испытуемых животных не отличалась более, чем на 10-15 % от средней массы особи одного пола.

За 24 часа до исследования основной группе из 10 животных выстригалась шерсть в области спины до 5 см в диметре (Рисунок 3а). Влажные целлюлозные пленки размером 2,5 х 25см наносили с равномерным давящим распределением по всей поверхности обработанного участка кожи однократно. Сверху для устойчивости материал фиксировался тугой повязкой (Рисунок 3б). Таким образом при нанесении кусочка БЦ оценивали возможное его местное токсическое влияние на кожу. В контрольной группе из 10 особей на обработанную кожу наносили обычную марлевую повязку этого же размера, предварительно смоченную 0,9%

изотоническим раствором хлорида натрия. Регистрацию и оценку возможного острого токсического воздействия исследуемых целлюлозных биопленок по кожным реакциям осуществляли сразу после их нанесения и в дальнейшем через 1, 2, 24, 48, 72 часа. Появление отечности, покраснения кожи, наличие кровоизлияний, трещин, изъязвлений, сухих корочек считали главными критериями токсического воздействия. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ позволили стандартизировать интенсивность раздражающего действия БЦ и выразить основой показатель на основе бальной шкалы.

Рисунок 3 а, б – Определение острой накожной токсичности биоцеллюлозы: формирование площадки на спинке животного для эксперимента (а), фиксация биопленки на поверхности кожи крыс (б)

В течение всего эксперимента кормление животных осуществлялось на основе стандартного пищевого рациона питания. В течение 24 часов производился учет потребления воды и корма, особенно до и после нанесения гель-пленки на раневую поверхность животного. Дополнительно, для оценки возможного общего

токсического воздействия БЦ у животных перед нанесением пленки фиксировалась масса тела, а затем в она же измерялась течение последующих 72 часов. Каждое животное наблюдали отдельно непрерывно в течение первых 24 часов. После нанесения целлюлозной пленки на кожу особое внимание уделялось первым 8-ми часам эксперимента. С учетом возможным развитием картины интоксикации на протяжении 14 дней наблюдение за животными осуществлялось в утреннее и вечернее время. Крыс осматривали, как на открытой поверхности, так и на руках, так и в клетках. Значительные изменения поведенческих реакций, в том числе нарушения потребления пищи и воды, дефекации, частоты дыхания, температуры тела, локомоция и груминг считали токсическим проявлением на общее состояние. Сравнительное гистологическое исследование производили через 2 недели после забора органокомплекса с предварительной эвтаназией крыс каждой группы под наркозом. Наряду с местными изменениями окружающих тканей в критерии оценки острой накожной токсичности при использовании целлюлозных гель-пленок вошли изменения в поведении крыс, наличие общей клинической картины интоксикации, а также учет возможного числа умерших особей со сроками их гибели. Полученные результаты в течение эксперимента заносились в индивидуальную карту исследования животного (Рисунок 4).

Экспериментальная карта № 1

Изучения острой токсичности

Подопытное животное: крыса
Пол: мужской
Доза исследуемого препарата: Бактериальная целлюлоза 2,5х2,5 см

Эксперимент начат: 25.07.2023 Эксперимент окончен:10.08.2023

Таблица 1

Сравнительная оценка массы тела экспериментального животного

Дата определения	До введения 25.07.2023	28.07.2023	02.08.2023	06.08.2023	09.12.2023
Вес, грамм	326,0	327,0	330,0	330,0	332,0

Таблица 2

Оценка общего состояния экспериментального животного

Показатели / Дата	Общее состояние	Поведение	Характер двигательной активности	Состояние кожных покровов, шерсти	Потребление корма и воды	Кожная реакция
25.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
26.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
27.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
28.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
29.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
30.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
31.07.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
01.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
02.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
03.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
04.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
05.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
06.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
07.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
08.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует
09.08.2023	норма	активны	активны	норма	в норме	отсутствует

Подпись исследователя_____

Рисунок 4 – Индивидуальная карта исследования лабораторного животного

Вторая часть по оценке безопасности включала определение непрямой цитотоксичности in vitro путем воздействия на дермальные фибробласты человека. Исследование проводили согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» (Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы «in vitro» методом экстракции).

Для исследования использовали 5-й пассаж линии клеток дермальных фибробластов, выделенных из кожи человека ранее по оригинальной усовершенствованной методике. Каждый образец целлюлозной пластины площадью 2 $см^2$ засевали полной ростовой средой (DMEM/F12, 10% FBS (Gibco), Anti-Anti (Gibco)) в количестве по 5 мл и выдерживали на протяжении 24 часов при 37 0С в СО2 инкубаторе (Binder, Германия). При этом предварительно подготавливали не менее 80% монослой клеток, путем засева 24 луночного планшета по 25 тысяч клеток в каждую лунку и заливали полной ростовой средой (DMEM/F12, 10% FBS (Gibco), Anti-Anti (Gibco) 0,5 мл) в количестве 1 мл в каждую.

Засев производился в 3 лунки для каждого образца. При достижении монослоя на 6 сутки производили замену ростовой среды на подготовленные экстракты. В контрольной группе производили смену новой ростовой средой и выдерживали клетки 24 часа в CO_2 инкубаторе при 37 ^{0}С и 5% CO_2. С помощью инвертированного микроскопа производили клеточную процентную оценку путем визуального осмотра клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым. Общеморфологические изменения, патология вакуолизации, расщепления, наличие лизиса клеток и повреждения клеточных мембран могли отражать наиболее значимые токсические проявления.

2.4 Экспериментальное исследование применения бактериальной целлюлозы в качестве раневого покрытия при лечении ожоговых ран

Экспериментальное исследование проводилось на модели свежих ран крыс после глубоких ожогов III степени. Модель глубокого ожога кожи воспроизводили у 60 беспородных крыс-самцов линии Wistar, массой 230 – 300 грамм с помощью однокомпонентного внутрибрюшного наркоза раствором Телазола в концентрации 1 мг/кг. Место ожога формировалась в межлопаточном пространстве спины крысы путем удаления шерсти с обработкой кожи 70% раствором этилового спирта. В последующем на нагревательной плите ПЛК-1818 производили нагревание до

температуры 180°С металлической стальной пластины, толщиной 0,5 см и имеющей размеры нагревательной поверхности 2,0 х 2,0 см, с ручкой длиной 15 см и общим весом 50 грамм (Рисунок 5а). В дальнейшем в течение 12 секунд осуществлялось плотное соприкосновение кожи животного с нагретой поверхностью пластины для формирования глубокого ожога кожи (Рисунок 5б), площадь поверхности которого соответствовало площади соприкасающейся пластины (Патент РФ № 2815760 от 21.03.2024 г. (Приложение А)).

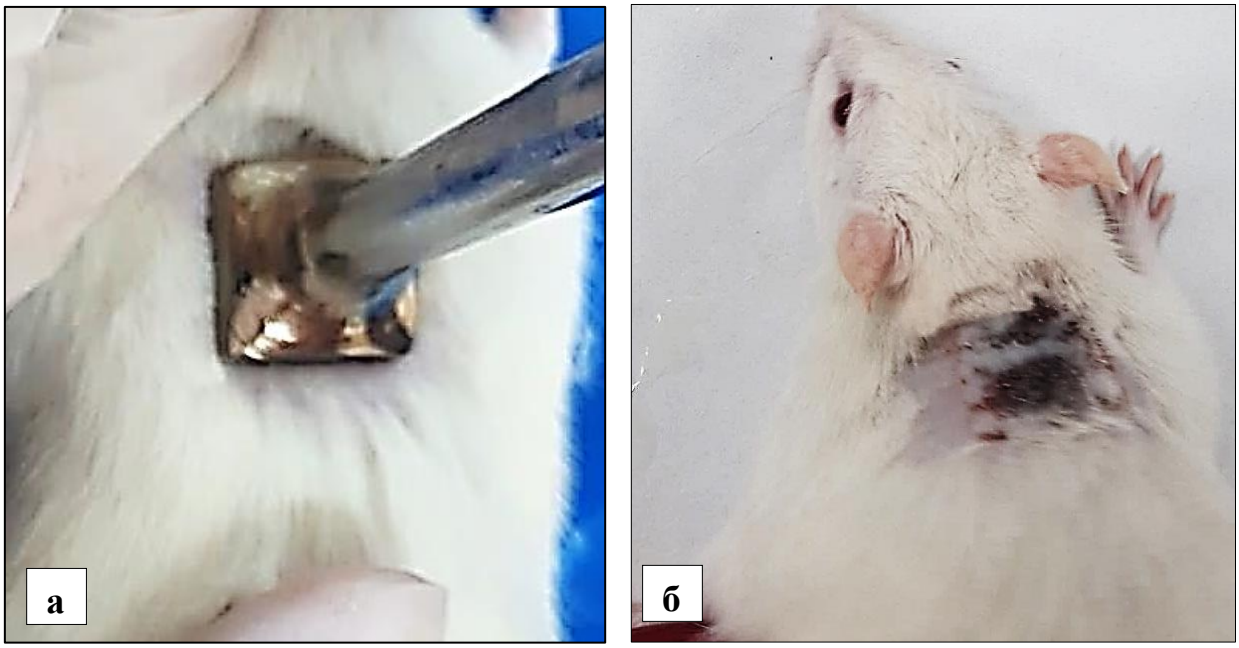


Рисунок 5 а, б – Формирование глубокого ожога кожи у лабораторного животного: контакт нагревающей пластины с кожей животного (а), площадь формируемого ожога (б)

В качестве раневых покрытий при лечении глубоких послеожоговых экспериментальных ран использовались пластины влажной целлюлозной гель-пленки, полученной в лаборатории биоконверсии ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск. Биоматериал имел размер 5,0х5,0 см и толщину среза от 2 до 3 мм. После стерилизации целлюлозные покрытия были расфасованы в пакеты из полимерной пленки и стеклянные флаконы. В пакетах находились образцы в 0,9%

изотонического раствора хлорида натрия для нанесения в 1 группе животных. В стеклянных флаконах БЦ находилась в 1% хлоргексидине и предназначалась для нанесения на кожу 2 группе животных (Рисунок 6).

Рисунок 6 – Пластиковые и стеклянные упаковки для содержания целлюлозных пленок (изотонический раствор натрия хлорида и 1% раствор хлоргексидина)

Спустя двое суток выполнялась некрэктомия ожогового струпа с последующим нанесением на раны (Рисунок 7а) исследуемых биоматериалов в разных группах и фиксацией их повязкой. Пластины с бактериальной целлюлозой укладывались на раневую поверхность на 3-5 суток (Рисунок 7б), после чего по мере высыхания и изменения цвета на серо-желтый во время повязки заменялись на новые.

На 5, 10, 20, 28 сутки после нанесения биопленок на раневую поверхность производилась оценка эффективности заживления ожоговых ран, при этом учитывалась скорость и сроки полного заживления на основе визуальной макроскопической картины с учетом патоморфологических и морфометрических критериев, микробного пейзажа ран. Дополнительно для оценки эффективности эпителизации раневой поверхности и общей клинической картины эксперимента учитывались лабораторные анализы крови с показателями развернутого анализа

крови, включающего гемоглобин, эритроциты, тромбоциты, лейкоциты, нейтрофилы, а также биохимического анализа крови с исследование уровней АЛТ, АСТ, креатинина, общего белка.

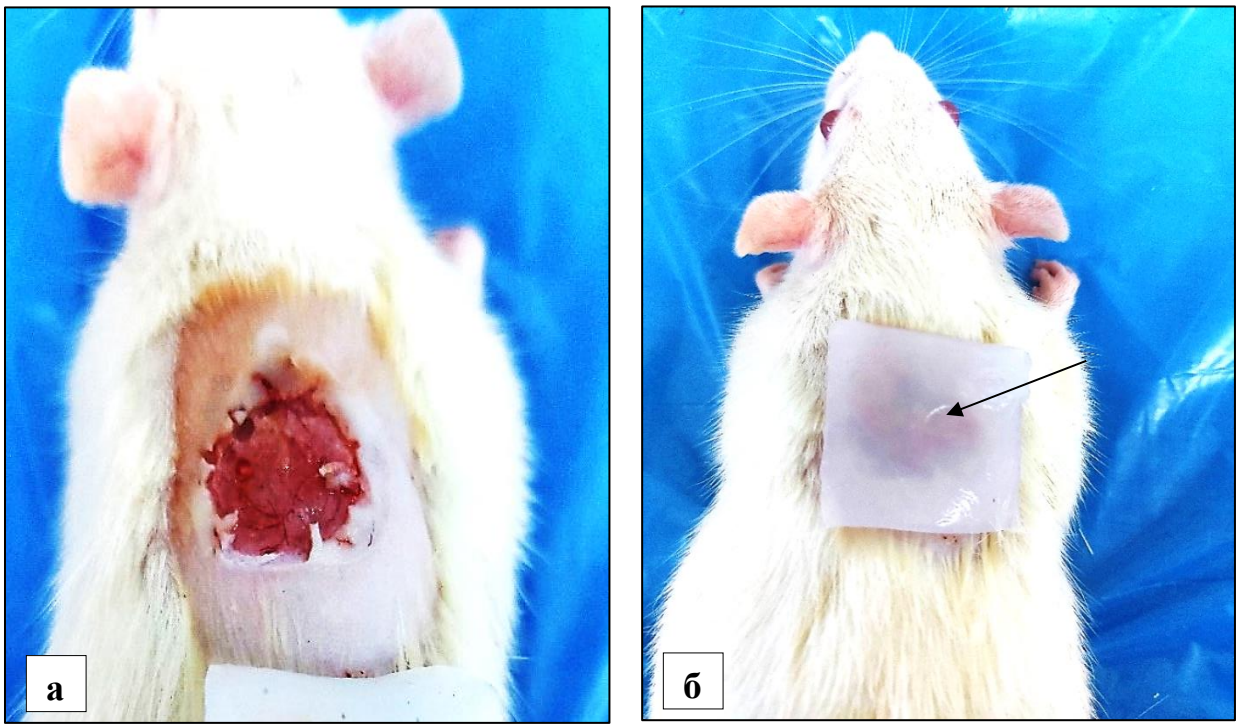


Рисунок 7 а, б – Экспериментальные исследования: сформированная после некрэктомии глубокая рана на спине крысы (а), на раневую поверхность нанесена целлюлозная гель-пленка (стрелка) (б)

Для проведения эксперимента из 80 беспородных крыс (самцы и самки) линии Wistar, масса которых варьировала от 200 до 240 грамм, были сформированы 4 группы, в каждую из которых вошло по 20 особей. Первая основная группа включала 20 крыс, лечение ожоговых ран которых осуществлялось на основе влажных целлюлозных покрытий, содержащихся в 0,9% изотоническом растворе хлорида натрия. Вторая основная группа из 20 крыс включала лечение ран влажными целлюлозными биопленками, находящихся в 1% растворе хлоргексидина и учитывала адсорбцию антисептика на материал. В третью группу, группу сравнения вошли 20 крыс, лечение ожоговых ран которых проводилось традиционным открытым методом с использованием ежедневных марлевых

повязок с мазью Левомеколь. И наконец 20 крыс составили контрольную 4 группу. В целом методология экспериментальной части работы заключалась в проведении клинико-лабораторных исследований у 60 экспериментальных животных с ожоговыми ранами кожи. В ходе исследования оценивался характер раневого процесса. При выборе сроков исследования учитывалась длительность течения послеожогового раневого процесса. Таким образом, критерии позволяющие оценить эффективность применения биологических целлюлозных раневых покрытий включали:

1. Клинический статус крыс с наблюдением за общим состоянием животных с измерением температуры тела, частоты дыхания, движений, оценки пульса.

2. Изучение регенерации ожоговой раны у крыс на 5, 10, 20, 28 сутки с использованием планиметрического метода исследования раневой поверхности.

3. Изучение на 5, 10, 20, 28 сутки после формирования ожоговых ран морфометрических и патоморфологических показателей их заживления у крыс в основных группах, группе сравнения и группе контроля.

4. Исследование на 5, 10, 20, 28 сутки после лечения ожоговой раны показателей гемоглобина, эритроцитов тромбоцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, а также уровней общего белка, креатинина, АЛТ, АСТ у животных контрольной и опытных групп.

5. Исследование на 5, 10, 20, 28 сутки лечения ожоговой раны показателей бактериальной контаминации по микробным посевам у животных в основных группах, группе сравнения и группе контроля.

Для оценки скорости репарации и эпителизации ран применялся планиметрический метод. После создания ожоговой раны в течение 28 суток наблюдений с интервалом в 5 суток с помощью миллиметровой бумаги определяли ее площадь путем переноса на прозрачную пленку контуров каждой раны. Для расчета абсолютной площади в мм^2 кожной раны применялась формула S= n+1/2k x C.

Показатель k указывал количество квадратов покрытия, размером 2,0 х 2,0 мм², частично закрывающий раневой контур, а показатель n соответствовал количеству квадратов пленки, размером 2,0 х 2,0 мм², полностью покрывающей рану. Площадь одного квадрата пленки, размером 2,0 х 2,0 мм² выражалась значением С. Оценка эффективности эпителизации производилась на основе индекса заживления по формуле S-Sn x 100/ S x T. Значение S указывало на площадь раны в мм^2 при предыдущем измерении, а в площадь раны в мм2 данном измерении отражал показатель Sn. На интервал в сутках между измерениями указывало значение Т. В ходе исследования проводилась визуальная оценка состояния раны, где отмечалось наличие или отсутствие гиперемии, отека, инфильтрации, раневого или гнойного отделяемого, наличие или отсутствие фибрина с включением двойного микробиологического и гистологического исследования как самой раны, так и целлюлозной пластины. Особенное во время ежедневного осмотра ожоговых ран отдельное внимание уделялось регистрации сроков образования и фиксации раневого струпа, наличие отека вокруг раны, сроки появления грануляционной ткани и краевой эпителизации, сроки полного заживления раны с наличием или отсутствие ее контаминации. Фотосъемка заживления ран, включая фотографии результатов гистологического исследования, позволяли четко подтвердить все этапы клинического и патоморфологического исследования.

2.5 Патоморфологические и морфометрические исследования

Для исследования использовали биоптаты кожи, полученные от экспериментальных животных крыс-самцов и самок линии Wistar в количестве по 6 образцов из каждой группы на 5, 10, 20, и 28 день эксперимента. Для этого после эвтаназии животного вырезали кусочек кожи размером 0,5х0,5 см и погружали на 24 часа для фиксации 10% формалиновый раствор. После окончания фиксации материал проводили в восьми порциях изопропилового спирта на автоматической станции, используемой для проводки TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakura, Nagano, Japan)

с последующей парафиновой заливкой. На роторном микротоме Accu-Cut SRM (Sakura, Japan) изготавливали гистологические срезы имеющих толщину от 4 до 8 мкм и окрашивали с помощью гематоксилин-эозина. Полученные препараты фотографировали при помощи микроскопа Zeiss Primo Star. Оценивали процентный состав воспалительного инфильтрата (лимфоциты, плазмоциты, макрофаги), фибробласты. Количество клеток воспалительного инфильтрата и число сосудов подсчитывали при увеличении х400 в 5 полях зрения в каждом случае в программа Image Tool 3.0. при помощи инструмента Coutand Tag. Патоморфологические исследования выполнены при изучении безопасности образцов БЦ (острая токсичность и цитотоксичность), а также оценке скорости заживления ран в период 5, 10, 20 и 28 суток.

2.6 Статистическая обработка полученных результатов

Статистический анализ данных осуществлялся с использованием программного обеспечения Statistica 10, пакета статистического анализа программы MS Exel 2016. Критерий Манна–Уитни применяли при оценке непараметрических критериев и сравнении двух независимых групп. Сравнение проводили между средними арифметическими совокупностей (M) и стандартными отклонениями (m) для групп с нормальным распределением с использование t-критерия, а также в виде медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей для групп с распределением, отличным от нормального, что позволяет оценить величину различий и их статистическую значимость. Достоверность статистических гипотез оценивали с использованием критического значения $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

3.1 Исследование острой токсичности бактериальной целлюлозы при накожном применении

Распределение животных по экспериментальным группам при накожном применении БЦ представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение экспериментальных животных по группам при моделировании острой токсичности

Группа животных	Режимы накожного применения БЦ в сравнении с контролем	Количество животных
Контрольная группа	Однократное нанесения марлевой повязки 2,5х2,5 см смоченной 0,9% раствором натрия хлорида	5 крыс самок 5 крыс самцов
Опытная группа	Однократное нанесение стерильной бактериальной целлюлозы 2,5х2,5 см	5 крыс самок 5 крыс самцов

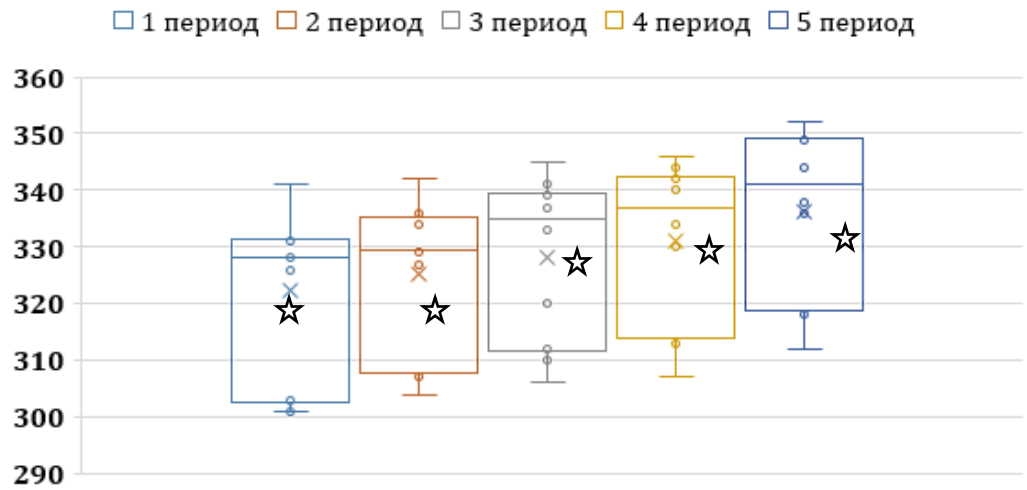
При изучении острой токсичности при накожном расположении БЦ установлено, что гибели крыс обеих полов в экспериментальной группе за 2 недели наблюдений зафиксировано не было (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты воздействия БЦ при однократном накожном введении

Вид	Пол	Размер целлюлозного покрытия (см)	Количество в группе / количество погибших	Выживаемость (в %)
Крысы	Самцы	2,5х2,5	10 / 0	100
Крысы	Самки	2,5х2,5	10 / 0	100

Поведенческие реакции в основной группе и в группе сравнения были обычными, объективных признаков наличия токсического воздействия в экспериментальной группе в течение 2-х недель не отмечено. Координация движений была нормальной, животные активны, хорошо употребляли воду и корм.

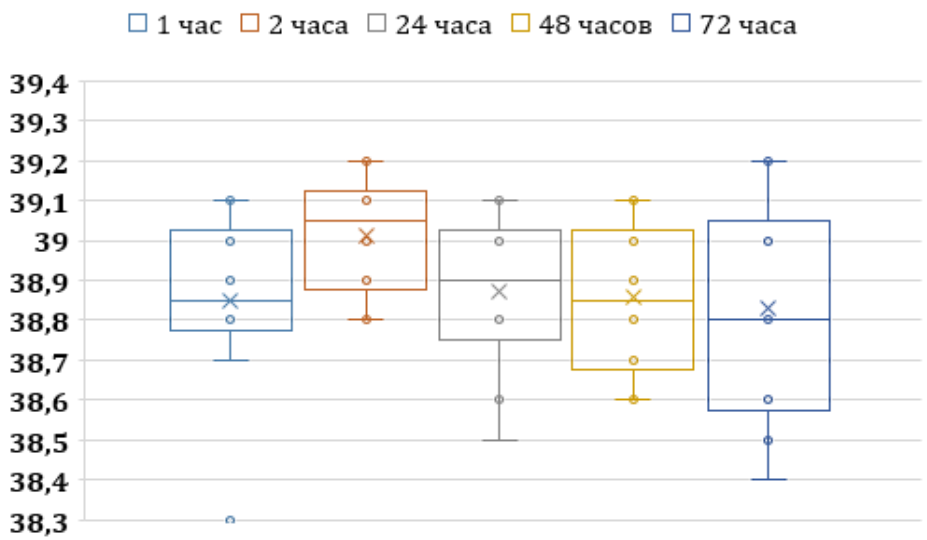
В группе самцов и самок крыс, которым наносили целлюлозный материал, наблюдалось постепенное, статистически значимое, увеличение массы тела по сравнению с исходным уровнем (Рисунок 8).



Примечание: * - значимость различий массы животных между периодами наблюдений ($p<0,05$)

Рисунок 8 – Сравнительная оценка массы тела экспериментальных животных на протяжении 14 суток наблюдений

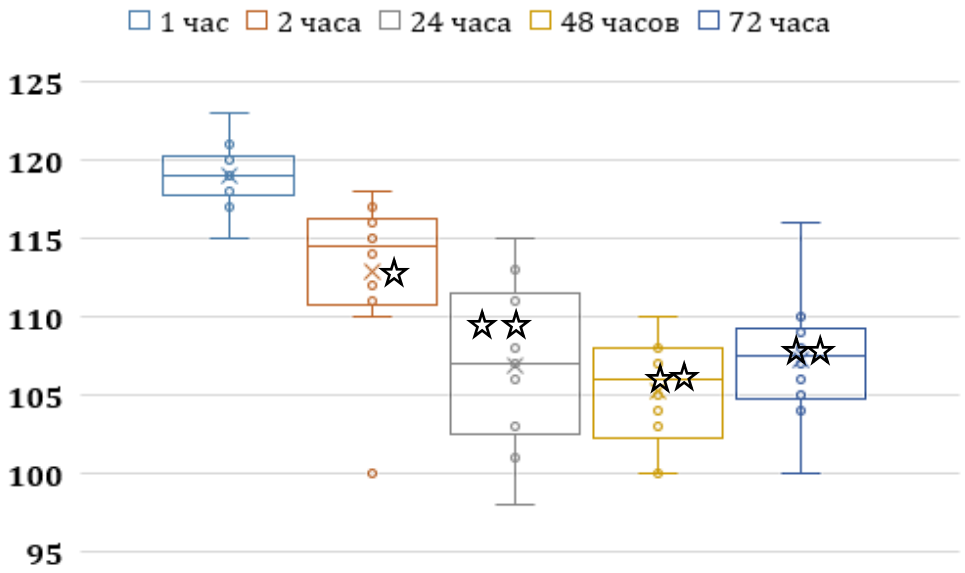
Наряду с этим физиологические отправления, показатели температуры были в пределах нормальных значений (Рисунок 9).



Примечание: отсутствие различий температурной реакции у животных в первые 72 часа наблюдений (p>0,05)

Рисунок 9 – Сравнительная оценка температуры экспериментальных животных на протяжении первых 72 часов наблюдений

Так в первый час наблюдений ее средние показатели были равны 38,9±0,10^0 С и к периоду 72 часов достоверно не изменились, составив в среднем 38,8±0,10^0 С. При исследованиях количества дыхательных движений в течении 72 часов наблюдений установлено (Рисунок 10), что в первый час эксперимента число дыхательных движений крыс было несколько чаще, достигая 119,0±0,7 дыхательных движений в минуту, что объяснялось поведенческой реакцией животных на анестезию и хирургическое вмешательство, с постепенным снижением ко второму часу (p<0,05) и нормализацией показателей в течение 72 часов (p<0,001). Значимых различий в частоте дыхательных движений спустя 24, 48 и 72 часа наблюдений не выявлено (p<0,05).



Примечание: * - значимость различий между 1 и 2 часом ($p<0,01$), ** - значимость различий между 1 часом и 24, 48,72 часами наблюдений ($p<0,001$)

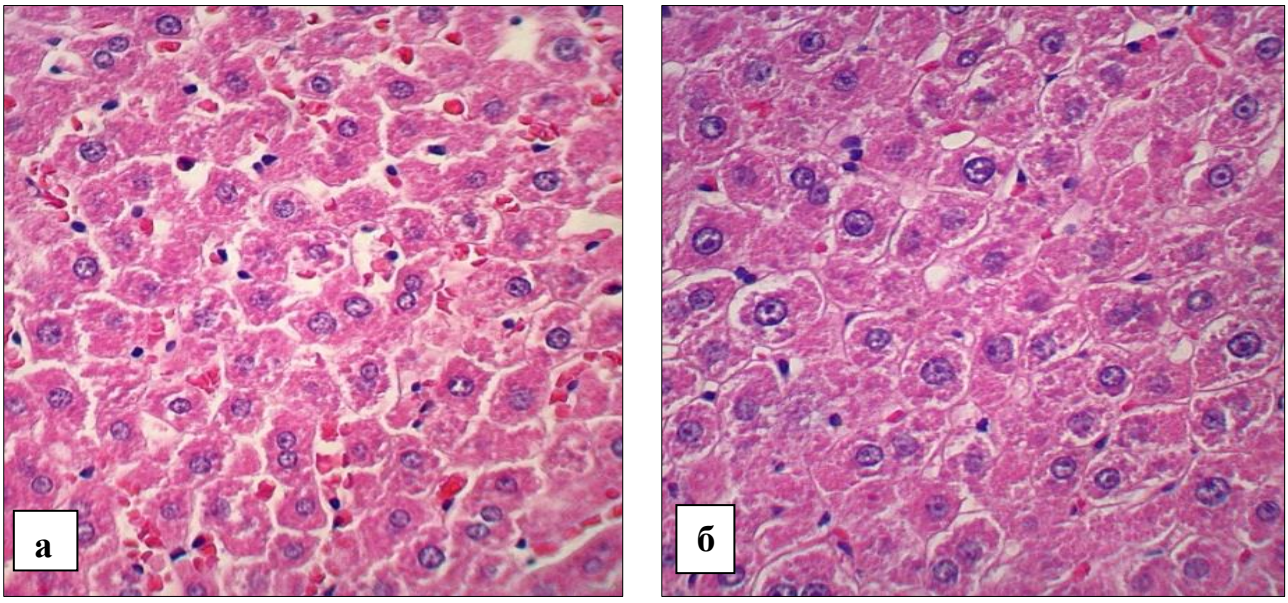
Рисунок 10 – Сравнительная оценка количества дыхательных движений экспериментальных животных на протяжении 72 часов наблюдений

Патологоанатомическая картина при аутопсии животных в опытных группах не отличалась от той, которая наблюдалась у контрольных животных.

3.2 Патоморфологическое исследование внутренних органов крыс при применении бактериальной целлюлозы

3.2.1 Патоморфологическая характеристика печени

В экспериментальной группе размеры гепатоцитов и их ядер были в норме, в цитоплазмах гепатоцитов четко были видны крупные гранулы гликогена. Полнокровие сосудов, стазы эритроцитов в синусоидных капиллярах и отек пространств Диссе не отмечались. Явления вакуольной дистрофии не определялись. В печени отмечали значительное число малых лимфоцитов (Рисунок 11а). В этой группе патоморфологическая картина была сходна с картиной в группе контроля (Рисунок 11б).



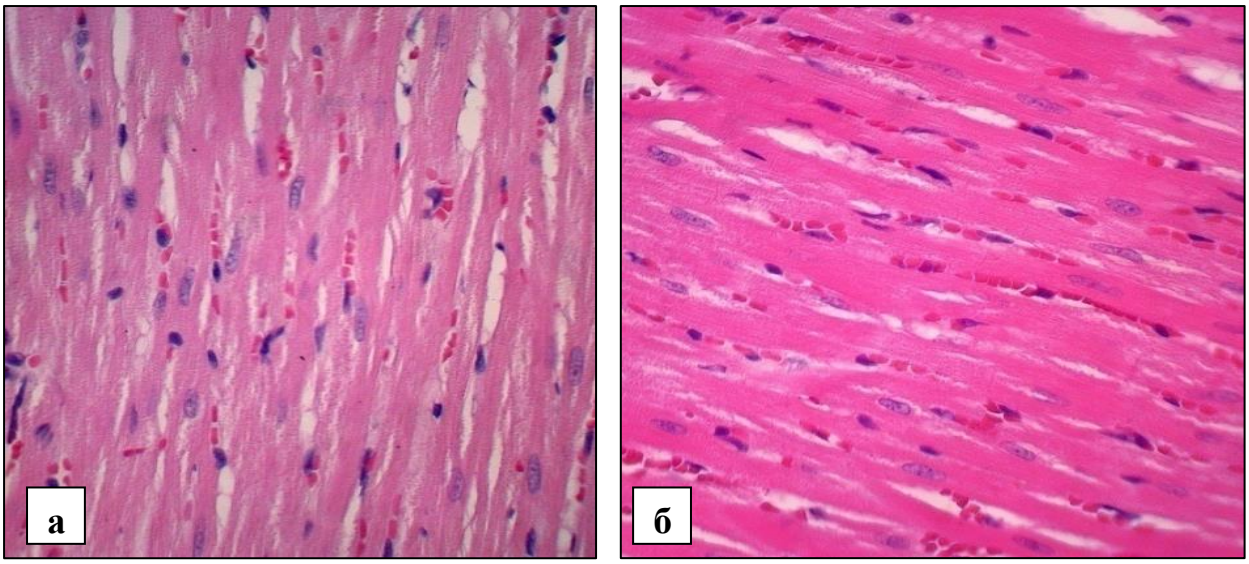
Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х 400

Рисунок 11 а, б – Сравнение патоморфологической картины печени крыс контрольной (а) и подопытной групп (б)

3.2.2 Патоморфологическая характеристика миокарда

В миокарде крыс группы контроля полнокровие и стазы в капиллярах отсутствовали, эритроциты в капиллярах были четко видны в виде цепочек (Рисунок 12).

Ядра кардиомиоцитов не увеличены в размерах, явления интерстициального отека отсутствовали (Рисунок 12а). Аналогичная картина наблюдалась и в подопытной группе (Рисунок 12б).

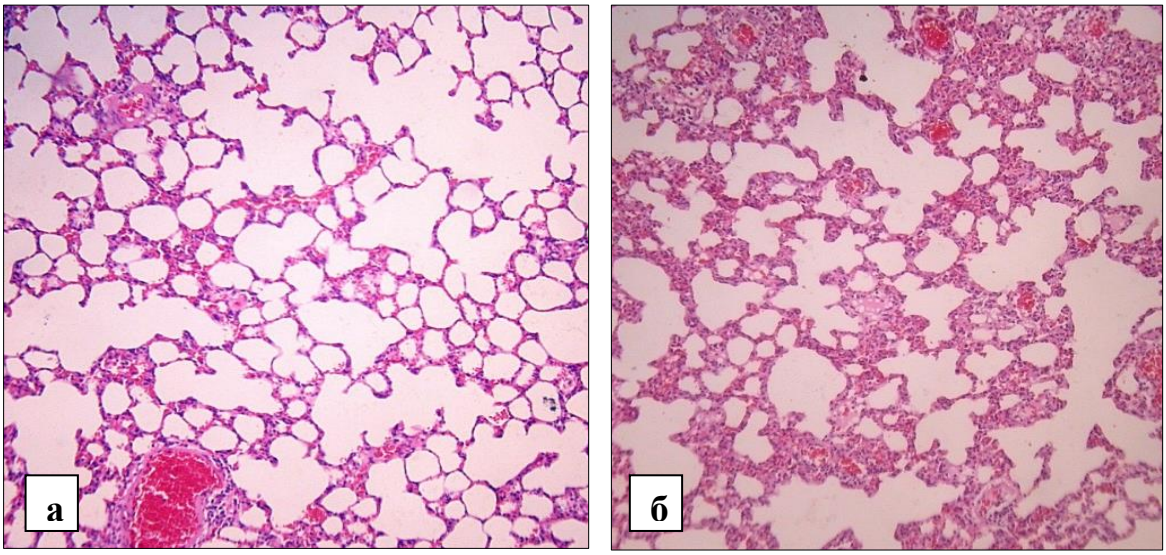


Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х 400

Рисунок 12 а, б – Сравнение патоморфологической картины миокарда крыс контрольной (а) и подопытной (б) группы

3.2.3 Патоморфологическая характеристика легких

В контрольной группе в легких экспериментальных животных изменения в сосудах и бронхах не выявляли (Рисунок 13).



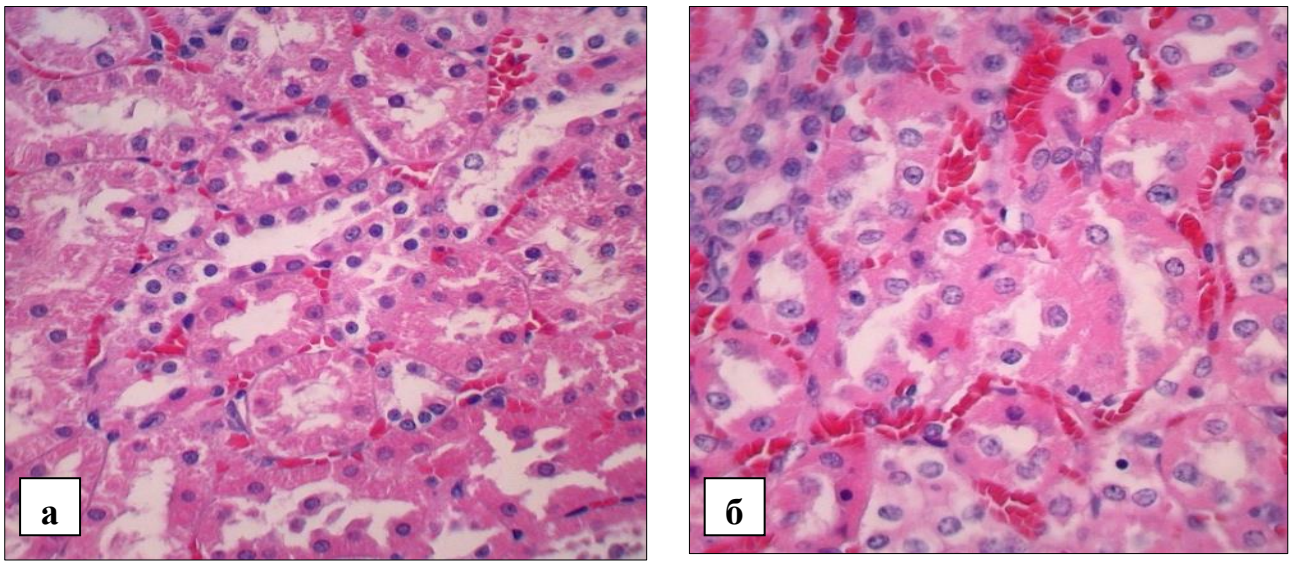
Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х 400

Рисунок 13 а, б – Сравнение патоморфологической картины легких крыс контрольной (а) и подопытных групп (б)

Сосуды находились в состоянии умеренно выраженного полнокровия, межальвеолярные перегородки были тонкими. Транссудата в альвеолах не было (Рисунок 13а). В подопытной группе патоморфологическая картина легких была сходна с картиной контрольной группы. Спазмы сосудов и бронхов не обнаруживались (Рисунок 13б).

3.2.4 Патоморфологическая характеристика почечной ткани

В контрольной группе исследования нефроциты и их ядра в норме, просветы канальцев были видны отчетливо (Рисунок 14а). В подопытной группе в почках крыс выявлялась патоморфологическая картина, аналогичная картине, найденной в почках крыс контрольной группы, но явления полнокровия сосудов уменьшались (Рисунок 14б).



Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х 400

Рисунок 14 а, б – Сравнение патоморфологической картины почек крыс контрольной (а) и подопытных групп (б)

Таким образом, патоморфологические исследования внутренних органов экспериментальных животных подтвердили отсутствие негативного действия изучаемого раневого покрытия на основе бактериальной наноцеллюлозы. Микроциркуляция и реология крови во внутренних органах экспериментальных

животных была в норме, развитие стазов и сладж-феномена в капиллярах печени, миокарда, почки не наблюдалось.

3.3 Исследование цитотоксичности экстракта бактериальной целлюлозы при контакте с дермальными фибробластами человека

Общеморфологические нарушения, патология вакуолизации, расщепление и лизис клеток и целостность мембран клеток служили критериями количественной оценки структуры клеток при определении цитотоксичности образцов целлюлозных мембран «in vitro». Процентные соотношения отражали итоговые результаты работы (Таблица 3).

Таблица 3 – Показатели качественной оценки изменения фибробластов человека после добавления экстрактов биоцеллюлозной пленки

Показатель	**образец 1** M±m	**образец 2** M±m	**Контроль** M±m	P
Монослой клеток (%)	85,0±2,4*	85,1±2,1**	88,3±2,6[k]	p>0,05
Фибробластоподобная морфология (%)	90,2±1,8	88,1±1,6	92,3±1,4	p>0,05
Вакуолизация цитоплазмы, клеточные включения, дебрис (%)	3	1	2	p>0,05
Примечание: значимость различий между образцами БЦ в сравнении с контролем (p>0,05)				

В группах отсутствовали различия фибробластов по наличию морфологических изменений, в частности по наличию монослоя (p>0,05), фибробластоподобной клеточной морфологии (p>0,05), вакуолизации цитоплазмы, клеточному дебрису и включениям, что отражено в таблице 4.

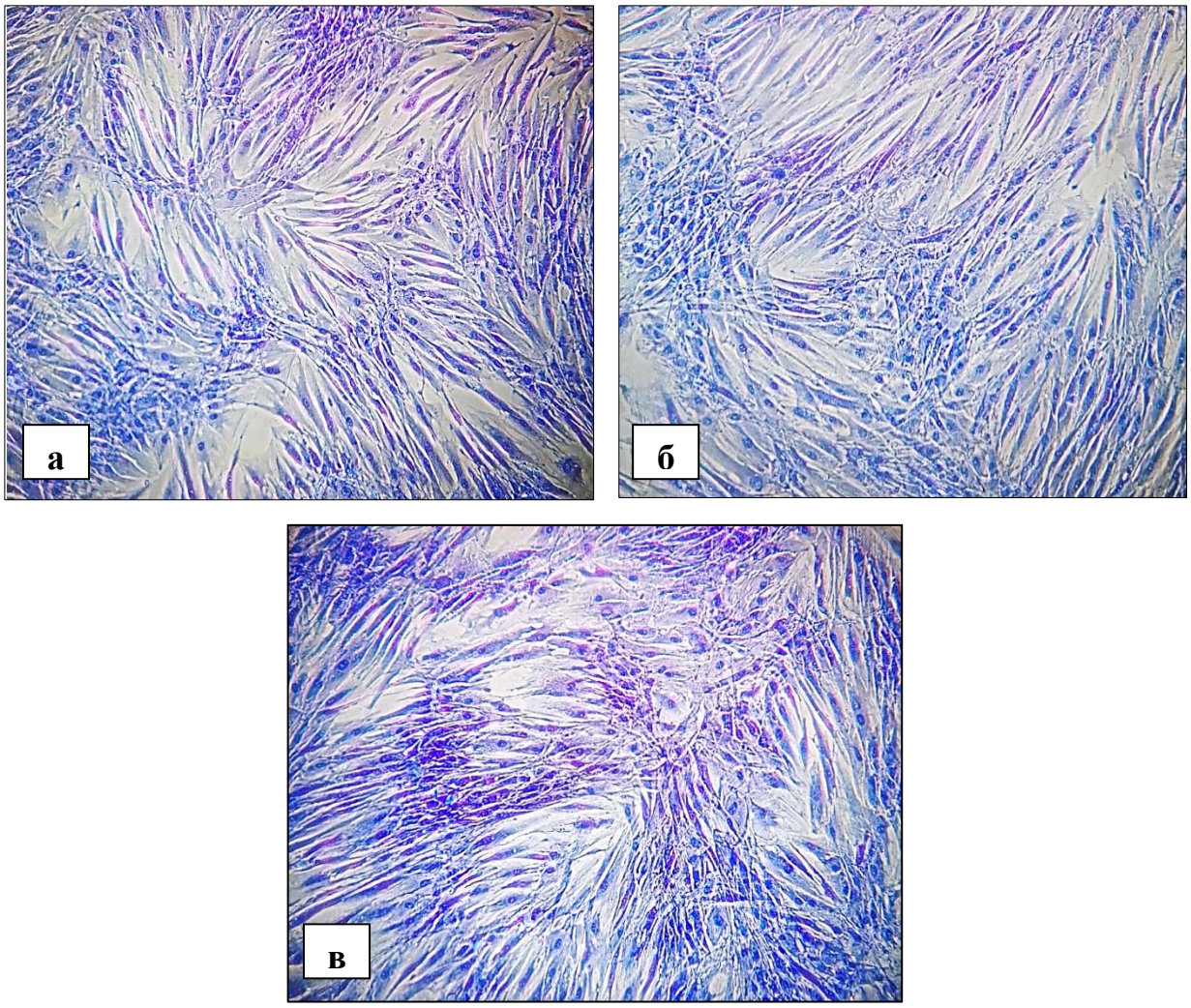
Из данных таблицы следует, что клетки из первой и второй группы имели незначительное число различий по патоморфологической структуре по направлению и распределению с клетками контрольной группы (Рисунок 15 а,б,в).

Структура цитоплазмы была умеренной плотной, хотя клеточные контуры цитоплазмы не имели четкие очертания. Скорость образования монослоя не подтвердила значимость различий в сравниваемых образцах клеток. Во всех чашках клетки во располагались последовательно, при этом поверхность культурального сосуда они занимали примерно на 85%.

Таблица 4 – Показатели качественной оценки клеток кожи после добавления целлюлозных экстрактов

Показатель	**1 образец**	**2 образец**	**Контроль**
Монослой клеток	Да	Да	Да
Расположение клеток	Параллельно друг другу	Параллельно друг другу, образуя пучки, завитки	Параллельно друг другу, образуя пучки, завитки
Форма клеток	Веретено-образная	Веретено-образная	Веретено-образная
Форма ядра, расположение	Расположено по центру, овальное	Расположено по центру, овальное	Расположено по центру, овальное
Ядрышки, количество, размер	2-4, одинаковой формы и размера	2-4, одинаковой формы и размера	2-5, одинаковой формы и размера
Цитоплазма	Умеренная	Умеренная	Умеренная
Вакуоли, включения	нет	нет	нет

Клеток основных групп имели типично морфологическое строение, характерное для классических фибробластов, где можно было увидеть размещающиеся параллельно друг другу от 2 до 4 ядрышек с расположенными по центру овальными ядрами. Веретеновидная форма всегда была присуща для клеток всех групп (Рисунок 15). Группы не имели различий по процессам вакуолизации, наличию лизиса и дебриса клеток. Проведенные исследования свидетельствовали, что целлюлозные экстракты не проявляют цитотоксического действия по отношению к дермальным фибробластам человека, в отношении которых осуществлялось тестирование.



Примечание: Окраска генцианвиолет, увеличение х10

Рисунок 15, а, б, в – Вид дермальных фибробластов человека: группы 1 (а), группы 2 (б), контрольной группы (в)

РЕЗЮМЕ

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований по определению острой накожной токсичности и цитотоксичности образцов бактериальной наноцеллюлозы, произведенной в лаборатории биоконверсии института проблем химико-энергетических технологий СО РАН (г. Бийск) было установлено, что материал не обладает токсическим действием и его можно отнести к IV классу опасности химических веществ и, в частности к малоопасным веществам. Однократное нанесение на кожу стерильных образцов бактериальных целлюлозных пленок размером 2,5 х 2,5 см не сопровождается наличием летальных исходов среди экспериментальных животных. Объективных признаков интоксикации в виде увеличения частоты дыхательных движений, повышения температуры и изменений поведенческих реакций животных за весь период экспериментальных исследований не выявлено. На протяжении 2 недель наблюдений масса тела самцов и самок крыс имела отчетливую тенденцию к увеличению. Патоморфологические изменения внутренних органов экспериментальных животных соответствовали таковым в группе контроля. Не было и проявлений цитотоксичности, что доказывалось отсутствием изменений патоморфологии и морфоструктуры дермальных клеток человека основной группы при смешивании с биопленками целлюлозы in vitro, по сравнению с контролем.

ГЛАВА 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОЖОГОВЫХ РАН

4.1 Изменения площади и микробного спектра ожоговых ран при лечении с помощью раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы в эксперименте

Экспериментальные клинические наблюдения на 2 этапе показали, что в течение первых 24 часов после ожоговой травмы у всех лабораторных животных была нарушена координация движений. Крысы были вялые и адинамичные, больше лежали и спали. В первые сутки после нанесения ожога во всех группах отмечено повышенное потребление воды и снижение потребления корма. После создания глубокого ожога кожи 3 степени в течение первых суток при объективном осмотре в месте повреждения во всех 3 группах было установлено формирование участка сухого коагуляционного некроза серо-черного цвета.

На фоне индукции новой внутрибрюшной анестезии на 5 сутки проводилась некрэктомия с удалением струпа. После этого с целью изолирования от внешней среды на раневые поверхности животным первой и второй группы на несколько дней накладывали влажные целлюлозные биопластины. Для животных 1 группы они находились в изотоническом растворе хлорида натрия, а для 2 группе крыс материал фиксировался в 1% растворе хлоргексидина. Особям 3 группы (группа сравнения) осуществлялась ежедневная перевязка ожоговых ран с использованием мазевых повязок на основе водорастворимой мази Левомеколь. Такие свойства наноструктурных целлюлозных мембран, как влажность, пластичность и конгруэнтность позволяла биопленкам воспроизводить по площади раневую поверхность ожога, выравнивать и закрывать ее практически полностью. Таким образом формировались условия для формирования закрытой биосреды с целью

регенерации и заживления кожных дефектов у животных 1 и 2 группы. Через 3-5 суток в ранах крыс 1 и 2 группы образовывался струп серо-коричневого цвета вследствие высыхания целлюлозного материала (Рисунок 16 а, б). Это позволяло достигнуть плотную фиксацию материала не только на раневой поверхности, но и к краям кожной раны. Поэтому бинт, который накладывали сверху для дополнительной фиксации повязки, к ране не прилипал. Критерием к длительному нахождению струпа на поверхности раны до 10 суток служило отсутствие признаков инфицирования (подтекание гнойного экссудата, мокнутие, фрагментация), что позволяло во время перевязок его оставлять. Этим самым исключалась некрэктомия и дополнительная травма раны.

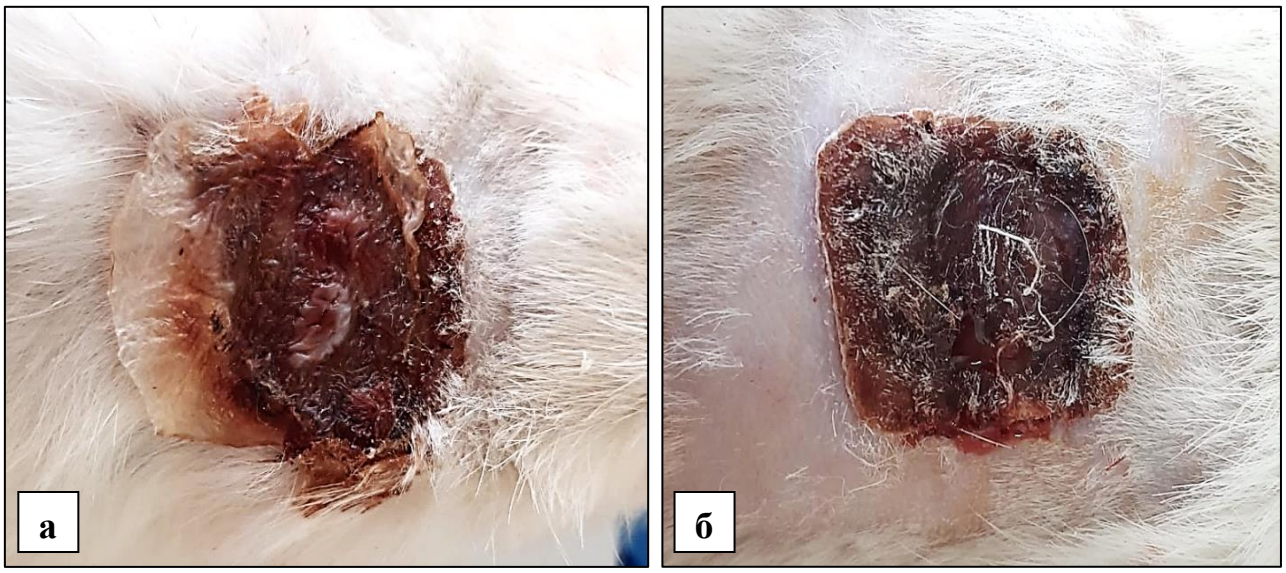


Рисунок 16 а, б – Ложе раны покрыто в виде сухого струпа высохшей целлюлозной пластиной: 5 сутки (а), 10 сутки (б)

Исследования ученых последних лет показали, что фазы заживления ран у человека длиннее, чем у крыс. Ускорение результатов репарации этих животных зависит от их повышенного метаболизма обмена веществ. Наши исследованиях подтвердили этот тезис и было отмечено, что уже на 8 сутки наблюдений раневые поверхности у всех животных трех групп начинали эпителизироваться. На скорость эпителизации ожоговых ран оказались больший эффект бактериальные

целлюлозные мембраны, что было подтверждено объективным исследованием с измерением площади ран в динамике. Уже на 5 сутки высохшие биопленки были хорошо фиксированы к ранам в 1 и 2 группе, хотя при ревизии под ними находилось небольшое количество серозного экссудата и отсутствовали элементы эпителизации раны (Рисунок 17а).

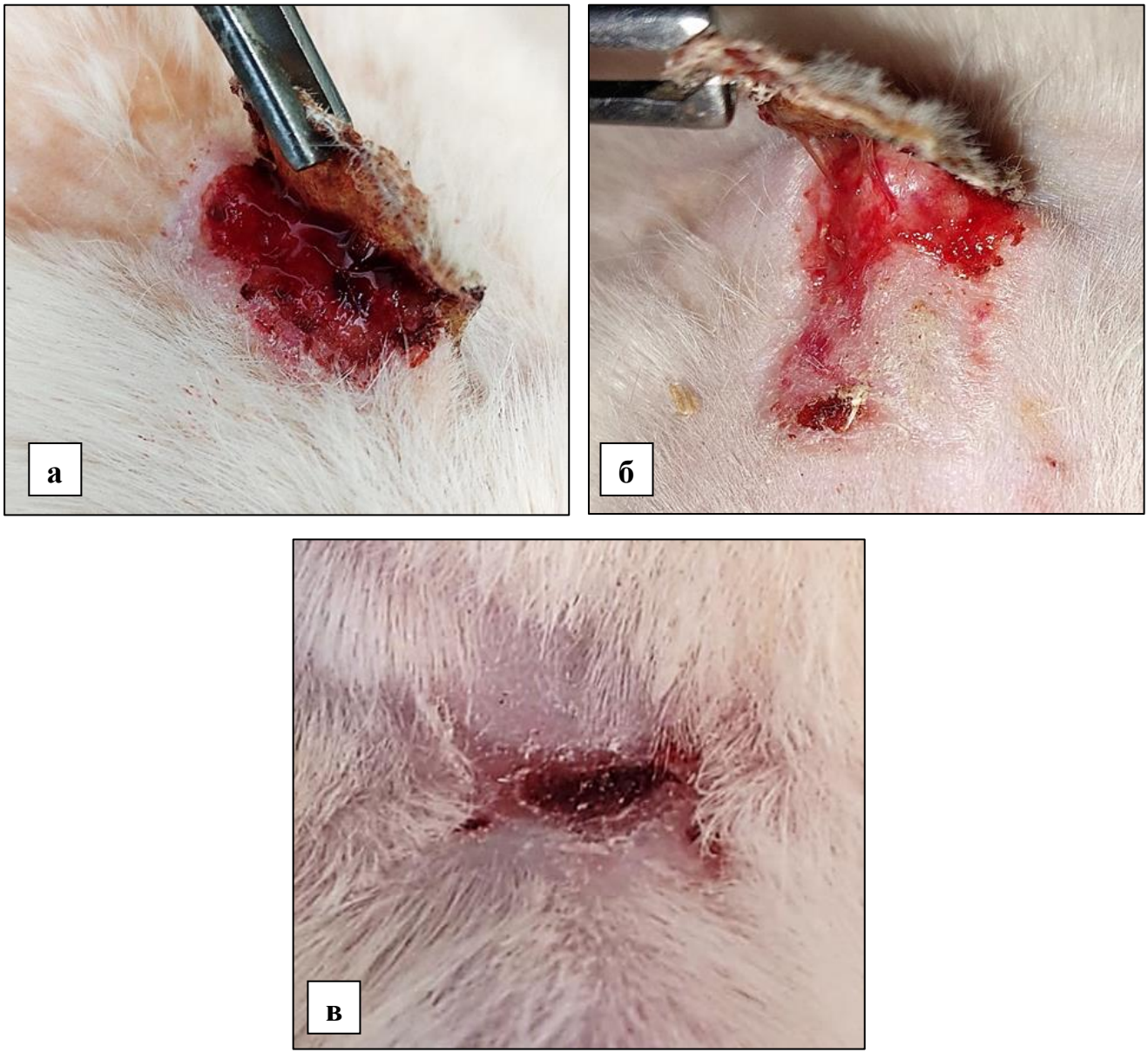


Рисунок 17 а, б, в – Фото ожоговых ран крыс 1 и 2 группы после удаления высохших целлюлозных пластинок: 5 сутки (а), 10 сутки (б) и 20 сутки (в)

После 10 суток эксперимента при удалении высохшей пластины почти на половине площади раны было отмечено заживление (Рисунок 17б). Закрытие раны к 20 суткам отмечается более чем на две трети площади раневой поверхности (Рисунок 17в). В 1 и 2 группе высохшие пластины снимались легко, кровотечения не было и подлежащие образующиеся молодые клетки при этом не повреждались. Признаков инфекции в виде абсцессов, скоплений гнойного экссудата не было.

В группе сравнения, где использовались ежедневные мазевые повязки на водорастворимой основе было установлено что ежедневно текстиль был плотно приклеен раневому ложу. Характерными чертами течения ран этой группы были признаки воспаления в виде мокнущего раневого детрита и серозно-геморрагического экссудата. Удаление марли при ежедневных перевязках сопровождалось травматизацией раны, что приводило к умеренной раневой диапидезной кровоточивости и сопровождалось беспокойным поведением животных.

При визуальной оценке также в этой группе уменьшение размеров раневого дефекта и его эпителизация на 5 и 10 сутки исследований шли медленнее, по сравнению с основными группами, где применялись биопленки на основе целлюлозы (Рисунок 18 а,б).

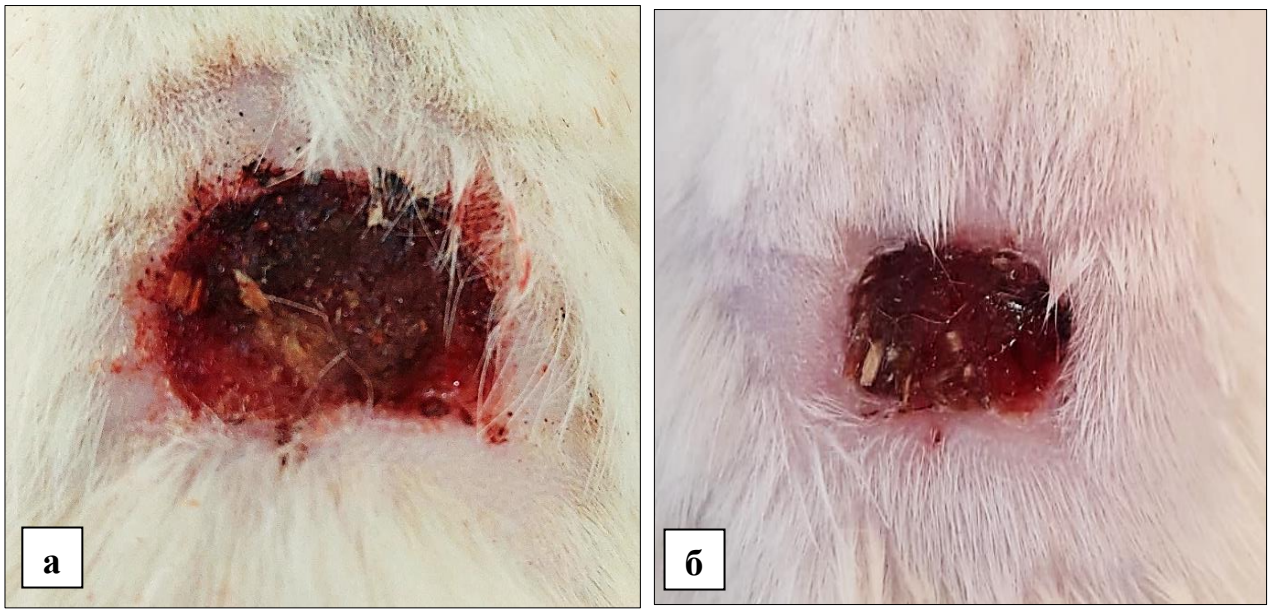


Рисунок 18 а, б – Фото ожоговой раны крысы с традиционным лечением мазью Левомеколь: на 5 сутки (а), на 10 сутки (б)

В группах исследуемых животных уменьшение площади раневой поверхности на 28 сутки происходило с разной скоростью (Таблица 5). Экспериментальные исследования показали, что на 15 сутки во всех трех группах животных отмечается уменьшение площади ожоговой поверхности (p>0,05). Наибольшая скорость заживления отмечена при использовании целлюлозных гель-пленок в 1 группе (на 47,3±1,8%) и во 2 группе (на 44,5±2,1%).

Таблица 5 – Результаты заживления ожоговых ран в 3 группах в течение 28 суток

Показатель	**Группа 1 (n=20)** M±m	**Группа 2 (n=20)** M±m	**Группа 3 (n=20)** M±m	**p_{1-2}**	**p_{1-3}**	**p_{2-3}**
Площадь раны $см^2$ на 3 сутки	36,4±0,8	35,8±0,6	37,1±0,5	>0,1	>0,1	>0,1
5 сутки	34,1±0,6	33,9±0,4	35,3±0,6	>0,1	>0,1	>0,1
10 сутки	26,4±0,8	27,6±0,6	31,2±0,6	>0,1	<0,001	<0,001
15 сутки	18,8±0,5	19,6±0,6	23,1±0,9	>0,05	<0,001	<0,01
20 сутки	8,1±0,8	10,4±0,9	15,2±0,5	>0,1	<0,001	<0,01
28 сутки	0,8±0,5	1,1±0,6	7,8±0,7	>0,1	<0,001	<0,001
% эпителизации раны	97,8±1,4	97,0±1,2	79,0±1,8	>0,1	<0,05	<0,05
Примечание: p – значимость различий при сравнении между группами скорости эпителизации раневой поверхности						

По сравнению в 3 группе заживление шло медленнее, лишь на 38,0±1,2% (p<0,05). На протяжении последующих суток во всех группах сохранялась эпителизация раневых дефектов, однако у животных в 1 и 2 группе, где использовались биопокрытия она была более быстрее (Рисунок 19 а, б).

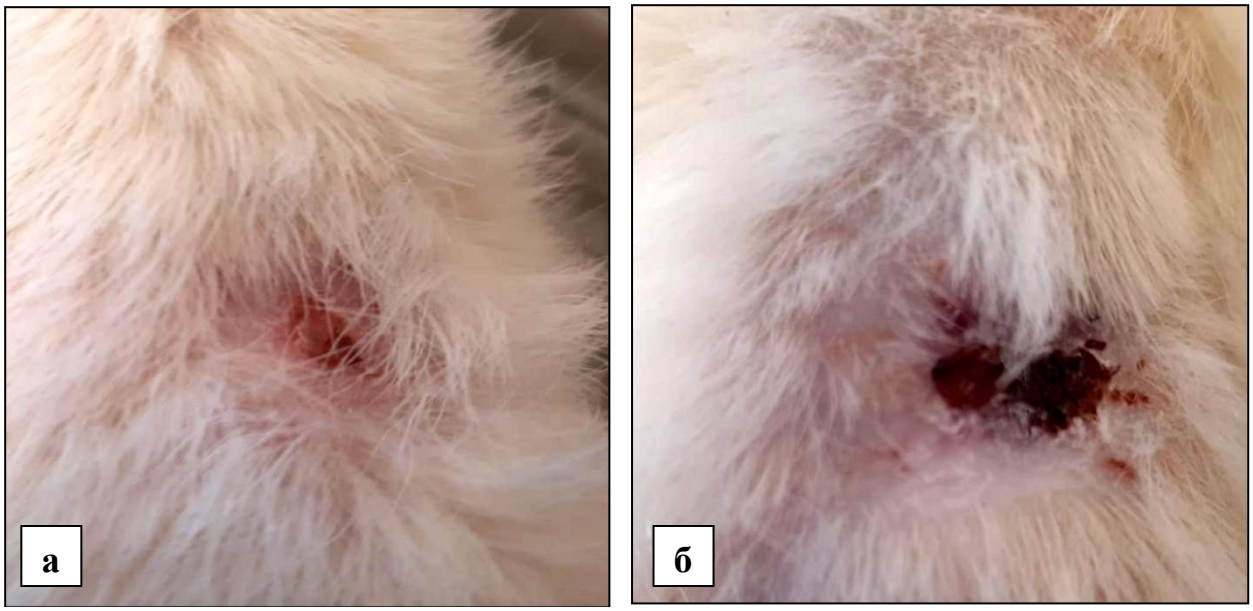


Рисунок 19 а, б – Фото ран крысы на 20 сутки: лечение с помощью целлюлозных биопокрытий (2 группа) (а), лечение раны с помощью мазевых повязок (3 группа) (б)

При сравнении с 15 сутками к 28 суткам течения раневого периода в первой группе площадь ожоговой поверхности сократилась на 95,8%, а во второй группе на 94,5%. В 3 группе этот процесс шел несколько медленнее, составив лишь 66,1% к окончанию лечения. Если брать в целом, то почти все ожоговые раны в обеих группах, где использовалась БЦ на 28 сутки, находились в стадии полной репарации и эпителизации. В итоге к окончанию лечения на 97,8±1,4% сократились площади ожоговых ран у крыс 1 группы, на 97,0±1,2% во 2 группе. Однако в 3 группе площадь уменьшилась только на 79,0±1,8% (таблица 5). Возможно более быстрый рост эпидермиса в ожоговой ране обеспечивается ее нахождением в закрытой среде, обеспеченной сформированным и хорошо фиксированным струпом из высохшей целлюлозной биопленки. Нет ежедневных перевязок, поэтому и нет повреждения раневой поверхности при контакте с перевязочным материалом. В этом случае напитанная экссудатом и высохшая БЦ действует, как механический барьер между раной и окружающей внешней средой, к тому же предотвращая ее микробную контаминацию. У всех животных 1 и 2

группы демаркации и отторжения струпа, находящегося на раневой поверхности в течение 10 суток, не наблюдалось, признаки инфицирования отсутствовали.

Бактериологические исследования показали, что на 5 сутки в посевах из глубоких постожоговых ран животных всех 3 групп доминировала условно-патогенная микрофлора, в основном представленная St. epidermidis. Концентрация ее во всех группах была не высокой и составляла 104 колониеобразующих единиц (КОЕ) ($p>0,05$). Это указывало на низкую микробную контаминацию ран. В последующем в ранах всех групп начинаются появляются новые штаммы, представленные E. Coli, Corynebacterium spp., P. mirabilis. В основном они были представлены в виде монокультур, но и регистрировались в ассоциациях, чаще всего со St. Epidermidis. Концентрация микроорганизмов в ранах по-прежнему остается не высокой и составляет 104 КОЕ. Но больше эти изменения выявляются в ранах крыс 3 группы, где они лечились открыто с использованием ежедневных перевязок с мазью Левомеколь. Изменение бактериального спектра на протяжении всего периода наблюдений в ожоговых ранах 3 групп крыс отражены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты бактериологических исследований ран в 3 группах животных с использованием в лечении различных технологий

Период	**Группа 1 (БЦ + физраствор)**	**Группа 2 (БЦ + хлоргексидин)**	**Группа 3 (м. Левомеколь)**
5 сутки	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4	Escherichia coli 10^4
	St. epidermidis 10^4 Escherichia coli 10^4	St.epidermidis 10^4	St. epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^2
	St. epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4	Escherichia coli 10^4
	St. epidermidis 10^4 Escherichia coli 10^4	Acinetobacter spp. 10^4 St.epidermidis 10^4	Corynebacterium spp. 10^4 Escherichia coli 10^4
	St. epidermidis 10^4	Acinetobacter spp. 10^4	St. epidermidis 10^4 Proteus mirabilis 10^4
10 сутки	St.epidermidis 10^3	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^2
	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4 Proteus mirabilis 10^4 Escherichia coli 10^3
	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4	Corynebacterium spp. 10^4
	St.epidermidis 10^4	St. epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^4	St.epidermidis 10^4 Escherichia coli 10^4
	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^2	Escherichia coli 10^4

Продолжение таблицы 6

Период	**Группа 1 (БЦ + физраствор)**	**Группа 2 (БЦ + хлоргексидин)**	**Группа 3 (м. Левомеколь)**
20 сутки	Нет роста	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^3
	Нет роста	St.epidermidis 10^2	St.epidermidis 10^4
	Нет роста	St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^4
	Нет роста	Escherichia coli 10^4 St.epidermidis 10^4	St.epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^4
	St.epidermidis 10^2	St.epidermidis 10^2	Escherichia coli 10^4
28 сутки	St.epidermidis 10^3 Corynebacterium spp. 10^2	St. epidermidis 10^3 Escherichia coli 10^2	St.epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^3
	St.epidermidis 10^2 Escherichia coli 10^2	St.epidermidis 10^3	St.epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^3
	St.epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^3	St.epidermidis 10^3	St.epidermidis 10^4 Corynebacterium spp. 10^3
	St.epidermidis 10^3	St.epidermidis 10^3	St.epidermidis 10^4
	St.epidermidis 10^4	Escherichia coli 10^2	St.epidermidis 10^4

Остается не ясным факт отсутствия роста микрофлоры на 20 сутки в посевах из ран животных 1 группы, где использовались целлюлозные покрытия, находящиеся в изотоническом растворе натрия хлорида.

Наряду с этим во второй группе с наличием целлюлозных биопленок с антисептиком микробное обсеменение ран не была значимой. В основном преобладанием штаммов St. epidermidis в концентрации 10^2 КОЕ. Примерно такая же тенденция в 1 и 2 группе прослеживается и к окончанию лечение где концентрация микробных штаммов снижается с 10^4 до 10^2, 10^3. В 3 группе имеется значимость различий ($p<0,05$) с основными группами по концентрации штаммов возбудителей, так как микробные значения контаминации ран этой группы сохраняются на том же уровне и составляют 10^4 колониеобразующих единиц.

В итоге результаты этого этапа экспериментов позволили сформировать вывод о том, что в основных группах, где использовались раневые покрытия на основе биоцеллюлозных гель-пленок (физраствор и 1% раствор хлоргексидина) имеются достоверно более лучшие условия для заживления ожоговых ран ($p<0,05$), выражающиеся в увеличении скорости заживлении раневой поверхности к 28 суткам наблюдений и меньшей степенью микробной контаминации, по сравнению

с 3 группой животных, где использовалось традиционное лечение. Нами установлена закономерность, что раневой материал, представленный целлюлозными биопленками у крыс с глубоким ожогом кожи 3 степени в процессе напитывания экссудатом и высыхания формирует ожоговых струп желто-коричневого цвета, отторжение которого происходит в большинстве случаев на 10 сутки нахождения в ране или несколько дольше после ее полной эпителизации. Для работы со свежей ожоговой раной в процессе перевязок на протяжении 28 суток достаточно двух или трехкратного применения биопленок на основе бакцеллюлозы. Положительные свойства биопленок на основе целлюлозных материалов, подтвержденные в результате экспериментальных исследований, заключаются в создании закрытой технологии ведения, препятствующей воздействию окружающей среды на рану, обеспечивающей защиту ее от дополнительных механических повреждений в процессе ежедневных перевязок. Главным моментом при создании данного направления в лечении является уменьшение экссудации ран и снижение их микробной контаминации.

В итоге проведенных исследований оказалось, что:

1. Получены экспериментальные доказательства безопасности целлюлозных биопленок в отношении их применения при лечении глубоких ожогов 3 степени у животных.

2. Скорость закрытия постожоговых ран в 1 и 2 группе с использованием покрытий на основе целлюлозных биоматериалов была близкой к 28 суткам наблюдений и достоверно превосходила по времени заживления ран в группе сравнения, значимо различаясь в среднем на 18,2% ($p<0,05$).

3. При высыхании биопленок целлюлозный материал хорошо прикрепляется к краям раны и после высыхания формирует над ней каркас, который препятствующий микробной контаминации. Закрытая среда создает условия для более эффективного заживления глубоких ран, что позволяет в тоже время

сократить количество перевязок, снизить болевой синдром и уменьшить нагрузку на медперсонал.

Результаты экспериментальной работы позволили сформировать основные позиции экспериментальной биомедицинской технологии лечения ожоговых ран с помощью целлюлозных гель-пленок:

1. Лечение глубоких ожоговых ран возможно с использованием стерильных влажных целлюлозных повязок, созданных с помощью химического гидролиза уксуснокислых бактерий, при этом материал может быть представлен в виде гель-пленок, толщиной от 2 до 4 мм, находящихся в герметичных пластиковых, стеклянных упаковках.

2. В качестве жидкой среды, для нахождения материала внутри упаковки, может быть использован стерильный 0,9% изотонический раствор натрия хлорида или антисептик в виде 1% раствор хлоргексидина.

3. На 3-5 сутки после некрэктомии на ожоговую поверхность с захватом не измененной кожи укладываются пластины БЦ определенного размера, на которые сверху наноситься сухая стерильная марлевая повязка.

4. Начиная с 2 суток пластины БЦ начинают высыхать, образуя над раной плотно фиксированный сухой струп коричневого цвета.

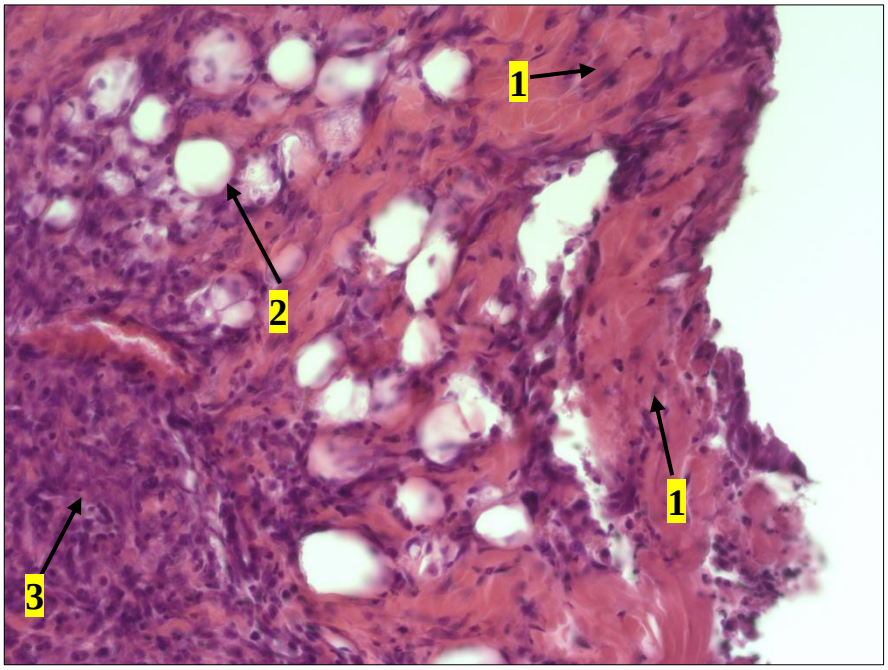
5. При отсутствии визуальных признаков инфицирования, экссудации образованная закрытая среда с помощью БЦ для заживления ожоговой раны под струпом может удерживаться до 10 суток, что уменьшает количество перевязок и травмирование образующихся в ране новых дермальных элементов (фибробласты, коллагеновые волокна, неососуды).

6. В последующем производиться некрэктомия и на рану накладывается новая пластина влажной БЦ.

4.2. Патоморфологические изменения ожоговых ран при использовании различных раневых покрытий

4.2.1 Патоморфологические изменения ожоговых ран в контрольной группе на 3 и 28 сутки

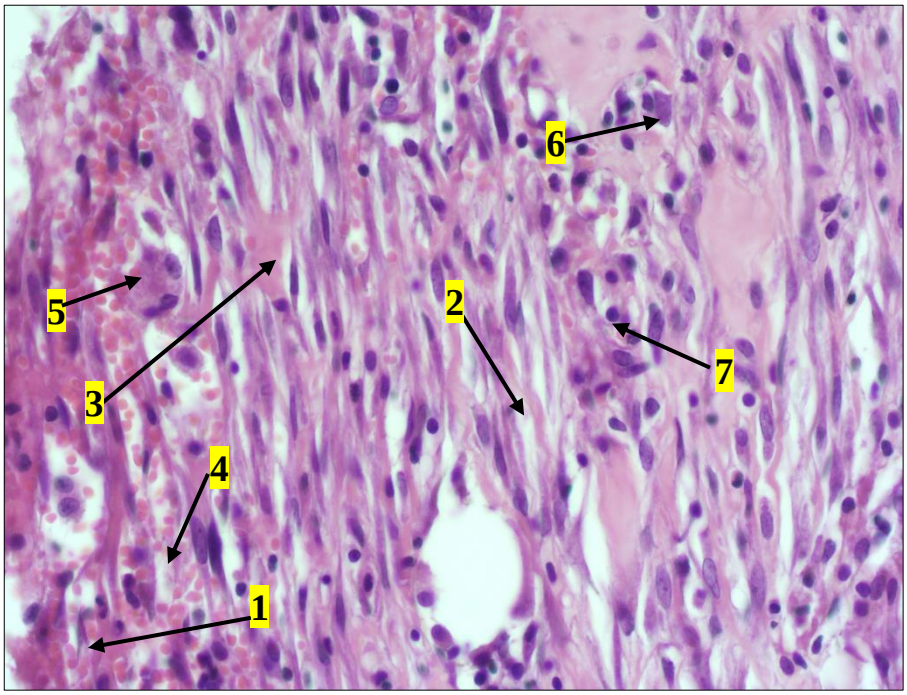
Патоморфологические исследования показали, что после некрэктомии и удаления ожогового детрита на 3 сутки в контрольной группе животных в материале определяется некроз эпидермиса с расплавлением верхних слоев дермы. Происходит набухание коллагеновых волокон с разрушением молодых фибробластов. Кровеносные сосуды умеренно расширены и не содержат агрегаты кровяных клеток. В подлежащих кожных слоях появилась плотная диффузная инфильтрация, представленная скоплением лимфоцитов и нейтрофилов (Рисунок 20).



Примечание: окраска гематоклислин-эозин, увеличение х400

Рисунок 20 – Микрофото ожоговой раны группы контроля на 5 сутки лечения: эпидермис и верхние слои дермы (1), отек (2), воспалительная инфильтрация глубоких слоев (3)

На 28 сутки на фоне заживления контрольной ожоговой раны имеется небольшой отек с образованием рыхлой грануляционной ткани, клетки которой представлены реактивными фибробластами с наличием тонких нитями коллагеновых волокон. В это время идет формирование новых кровеносных сосудов. Умеренно выраженный воспалительный инфильтрат представлен единичными нейтрофилами, лимфоцитами, эпителиоидными макрофагами, плазматическими клетками (Рисунок 21).



Примечание: окраска гематоклислин-эозин, увеличение х400: грануляционная ткань (1), межтканевой отек (2), волокна коллагена (3), кровеносные сосуды (4), макрофаги (5), плазматические клетки (6), нейтрофилы (7)

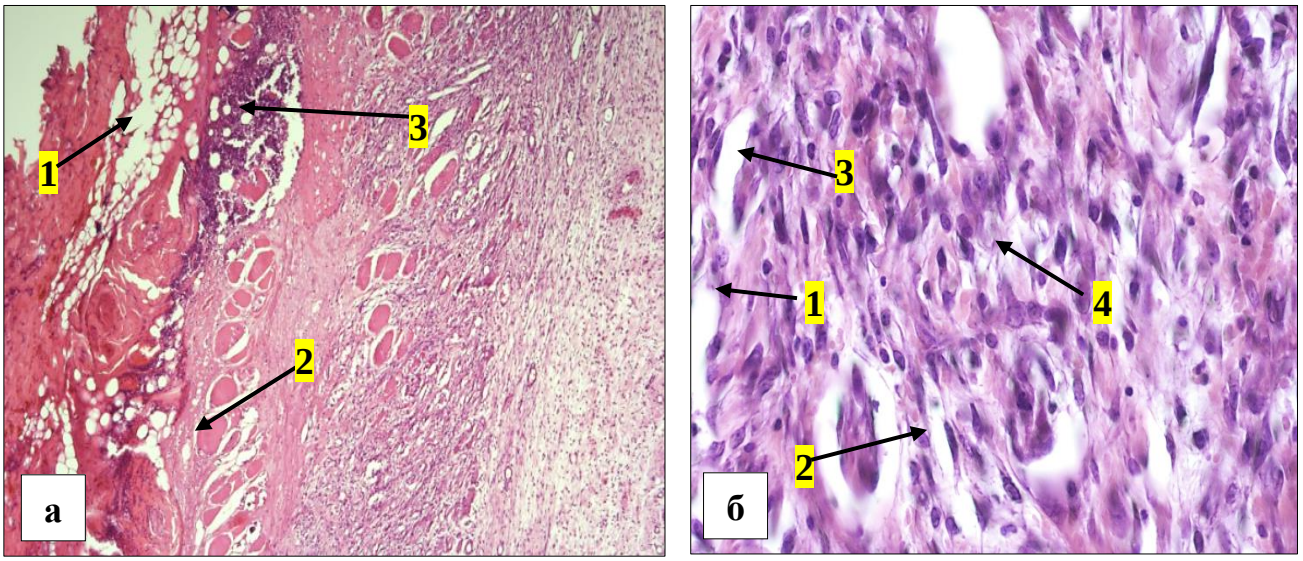
Рисунок 21 – Микрофото ожоговой раны группы контроля на 28 сутки

4.2.2 Патоморфологические изменения ожоговых ран группы с использованием бактериальной целлюлозы (физиологический раствор) на 5, 10, 20, 28 сутки

На 5 сутки после наложения пластин влажной БЦ на ожоговую рану отмечается набухание плотно прилегающих к поверхности раны фрагментов

бактериальной целлюлозы в виде ячеистых структур с образованием вокруг тканевой жидкости. Это может быть обусловлено явлениями сорбции БЦ образующегося экссудата.

В это время в глубоких слоях раны начинает формироваться умеренный воспалительный инфильтрат (Рисунок 22а), преимущественно за счет дегенеративных форм нейтрофилов и лимфоцитов. Подлежащие дермальные слои были отечны, утолщены, с фокусами кровоизлияний, также содержали большое количество нейтрофилов. В этот период регистрируется некоторая фрагментация образующихся коллагеновых волокон с частичным сохранением фибробластов (Рисунок 22б).



Примечание: Окраска гематоклислин-эозин, увеличение х100.

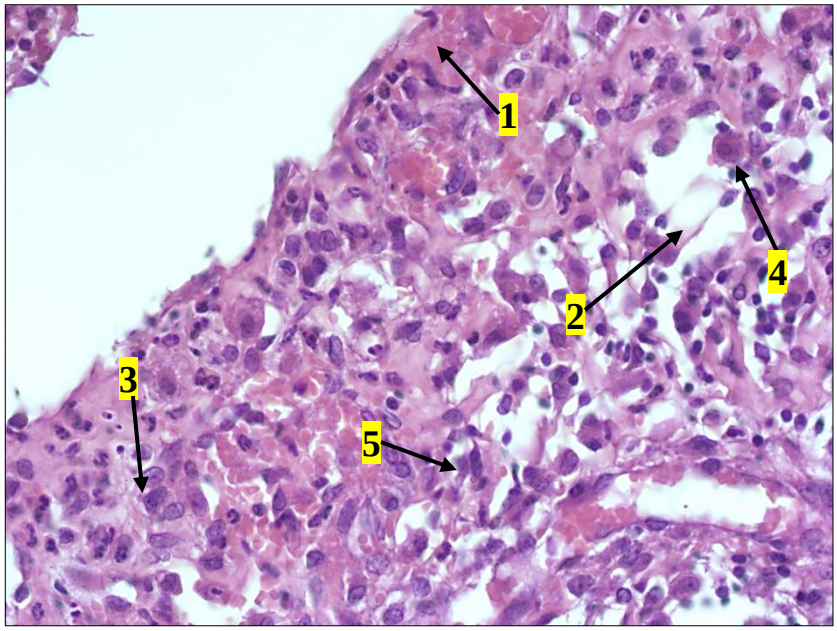
а - бактериальная целлюлоза (1), тканевая жидкость (2), воспалительный инфильтрат (3);

б - окраска гематоклислин-эозин, увеличение х400: коллагеновые волокна (1), фибробласты (2), нейтрофилы (3), лимфоциты (4)

Рисунок 22 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (физиологический раствор) на 5 сутки

Плотность воспалительного инфильтрата была равной 52,4±1,3%. При определении процентного состава клеток нейтрофилы составили 59,6±2,2%; лимфоциты – 18,9±1,1%; плазматические клетки – 5,4±0,8%; фибробласты –

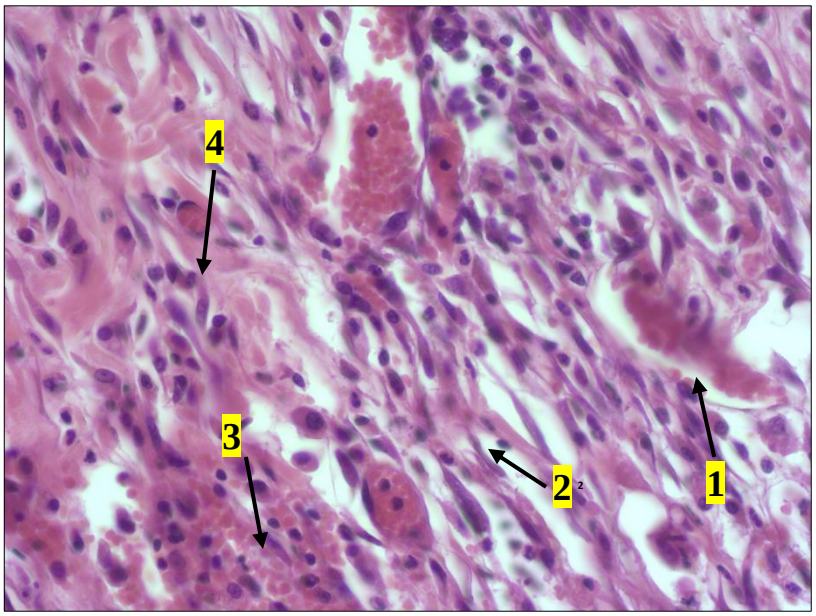
15,6±2,7%; макрофаги – 0,5±0,01%. Число сосудов в абсолютных значениях равнялось 3,5±0,3. На 10 сутки на ожоговой раневой поверхности происходит постепенное формирование нежной, молодой грануляционной ткани на фоне снижения тканевого отека, воспалительной реакции с появлением плазматических клеток и гистиоцитов. Начинают появляться умеренное количество реактивных фибробластов (Рисунок 23). Плотность воспалительного инфильтрата на 10-е сутки несколько увеличилась и составила 53,3±3,1 ($p>0.05$). При подсчете процентного состава клеток нейтрофилы значимо уменьшились до 50,9±1,8% ($p<0,01$), уровень лимфоцитов существенно не изменился - 19,2±3,6% ($p>0,05$), произошло увеличение плазматических клеток до 8,4±0,3% ($p<0,01$), макрофагов до 1,8±0,03% ($p<0,001$). Количество фибробластов значимо увеличилось до 19,7±4,1% ($p>0,05$). Количество кровеносных сосудов стало больше и составило 7,2±1,1 в абсолютных значениях ($p>0,01$).



Примечание: Окраска гематоксилин-эозин, увеличение х400. Грануляционная ткань (1), отек (2), гистиоциты (3), плазматические клетки (4), фибробласты (5)

Рисунок 23 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (физиологический раствор) на 10 сутки

На 20 сутки в группе с использованием БЦ + физраствор на месте ожоговой раны отмечается наличие незрелой грануляционной ткани с одновременным снижением тканевого отека. Наблюдается полнокровие тканей с образованием большого количества новых кровеносных сосудов. Сохраняется небольшая воспалительная реакции, преимущественно за счет лимфоцитов, гистиоцитов и плазматических клеток (Рисунок 24).

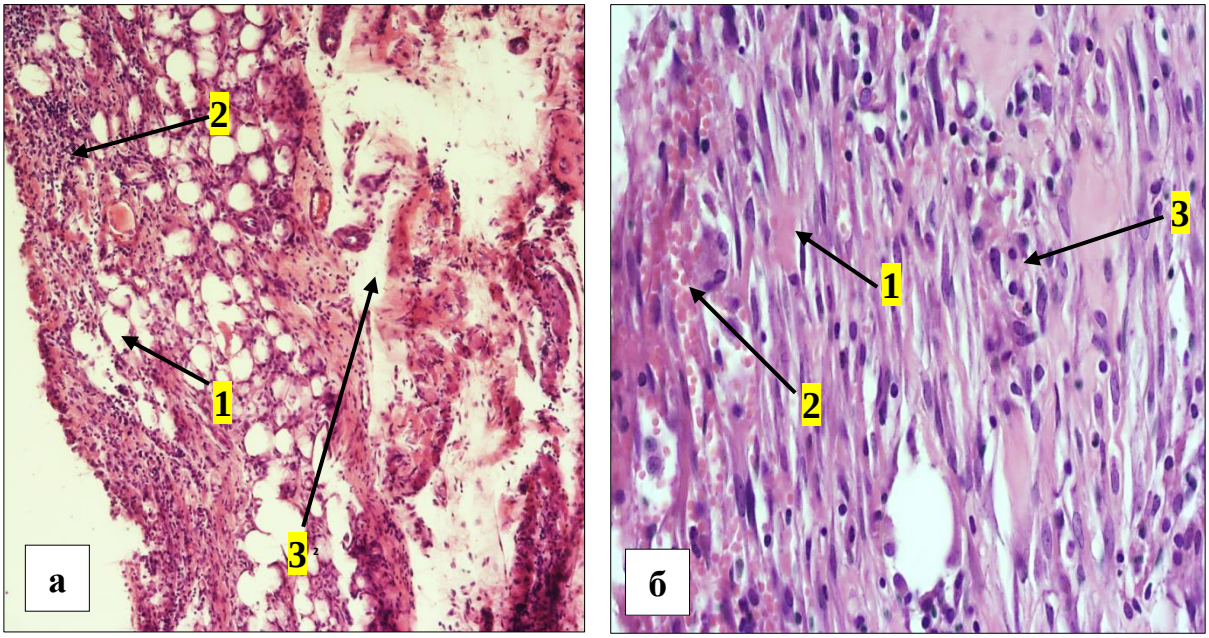


Примечание: Окраска гематоксилин-эозин, увеличение х400. Грануляционная ткань (1), отек (2), кровеносные сосуды (3), лимфоциты (4)

Рисунок 24 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (физиологический раствор) на 20 сутки

При этом плотность воспалительного инфильтрата по сравнению с 10 сутками снизилась и составила 41,7±1,8 ($p<0,01$). Также преимущественное процентное соотношение воспалительных клеток сместилось в сторону плазматических клеток и лимфоцитов 12,6±0,9% ($p<0,001$) и 20,7±2,4% ($p>0,05$) соответственно. Число нейтрофилов снизилось и составило 38,4±3,5% ($p<0,01$). Число фибробластов и кровеносных сосудов увеличилось и составило 25,1±3,0% ($p>0,05$) и 12,3±1,4 ($p<0,01$) соответственно.

К 28 суткам продолжается процесс образование незрелой грануляционной ткани с обрастанием фрагментов целлюлозы (при длительном ее нахождении). Сохраняется слабая хроническая нейтрофильная воспалительная реакция с отеком дермы (Рисунок 25а). Построение молодой грануляционной ткани идет за счет реактивных фибробластов, а также за счет светлых эозильных коллагеновых волокон, представленных в виде тонких прядей. Активно формируются кровеносные сосуды малого калибра (капиллярного типа). Сохраняется умеренный лимфоцитарно-плазмоцитарный инфильтрат (Рисунок 25б).



Примечание: Окраска гематоксилин-эозин.

а – фрагменты целлюлозы (1), воспалительная реакция (2), отек дермы (3);

б – пряди светлых коллагеновых волокон (1), кровеносные сосуды (2), инфильтрат (лимфоциты и плазмоциты) (3)

Рисунок 25 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (физиологический раствор) на 28 сутки

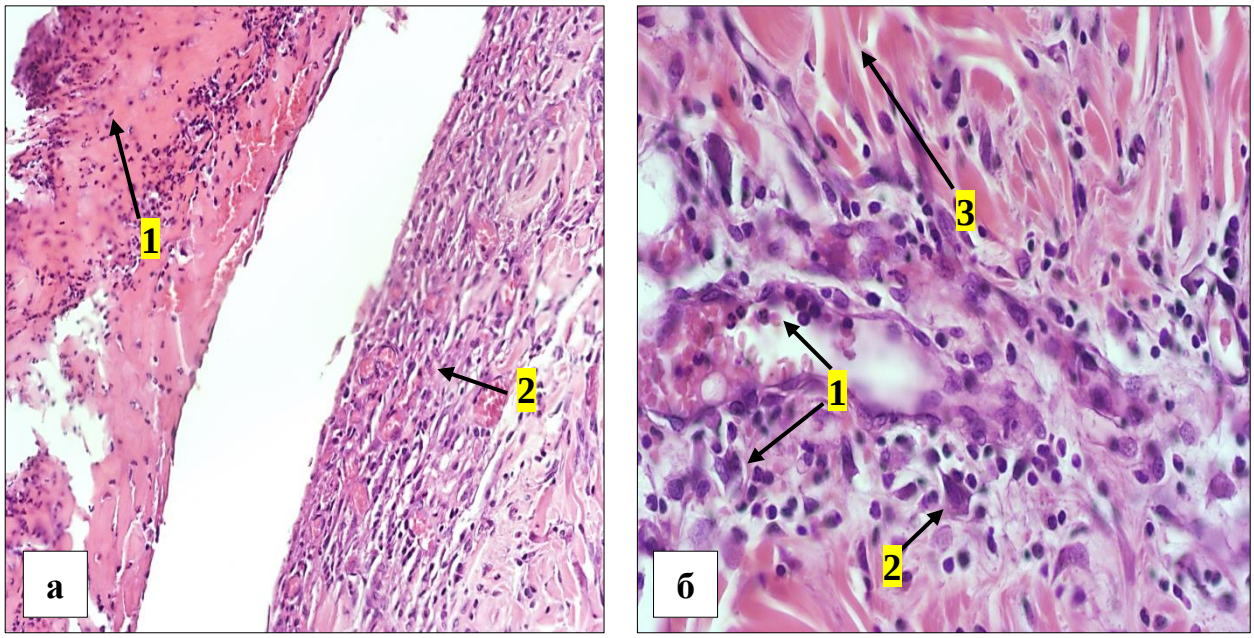
При подсчете клеток плотность воспалительного инфильтрата по сравнению с 20 сутками уменьшилась до 34,5±2,8 ($p<0,01$). При рассмотрении процентного состава клеток нейтрофилы снизились до 22,2±2,7% ($p<0,01$). Отмечается

увеличение лимфоцитов до 26,5±0,9% ($p<0,01$), плазматических клеток до 13,5±0,5% ($p>0,05$), фибробластов до 33,1±1,3% ($p<0,05$), макрофаги до 5,7±0,04% ($p<0,001$). Число сосудов в 5 полях зрения стало равным 12,5±0,8 ($p>0,05$). В итоге, начиная с 5 суток и к окончанию лечения воспалительный инфильтрат уменьшился на 34,2%, а количество нейтрофилов на 62,8%. К 28 суткам наблюдений произошло увеличение количества фибробластов на 42,9%, макрофагов на 91,2%, неососудов в поле зрения на 72%.

4.2.3 Патоморфологические изменения ожоговых ран в группе с использованием бактериальной целлюлозы (1% хлоргексидин) на 5, 10, 20, 28 сутки

В группе животных, где для лечения использовалась бактериальная целлюлоза с антисептиком (БЦ+1% хлоргексидин) на 5 сутки так же, как и при использовании целлюлозных пленок в изотоническом растворе хлорида натрия наблюдается образование на раневой поверхности плотной корочки, представленного высохшим воспалительным экссудатом, остатками целлюлозы, мертвыми некротическими клетками, фрагментам поврежденных нейтрофилов.

Подлежащие под струпом дермальные ткани со значительным кровенаполнением, отеком, небольшой воспалительной реакцией (Рисунок 26а), которая обусловлена расширением кровеносных сосудов и миграцией лейкоцитов в поврежденный очаг ткани с одновременным присутствием гистиоцитов. Кроме того, регистрируется отек дермы и пропитывание коллагеновых волокон воспалительным нейтрофильным и лимфоцитарным инфильтратом (Рисунок 26б). Плотность воспалительного инфильтрата составила 52,4±2,2, нейтрофилов 55,7±2,2%, лимфоцитов 23,2±0,9%, плазматических клеток –4,7±0,03%, фибробластов 16,1±1,8%, макрофагов 0,3±0,01%. Число сосудов в 5 полях зрения составило 3,8±0,3 (абсолютное значение).



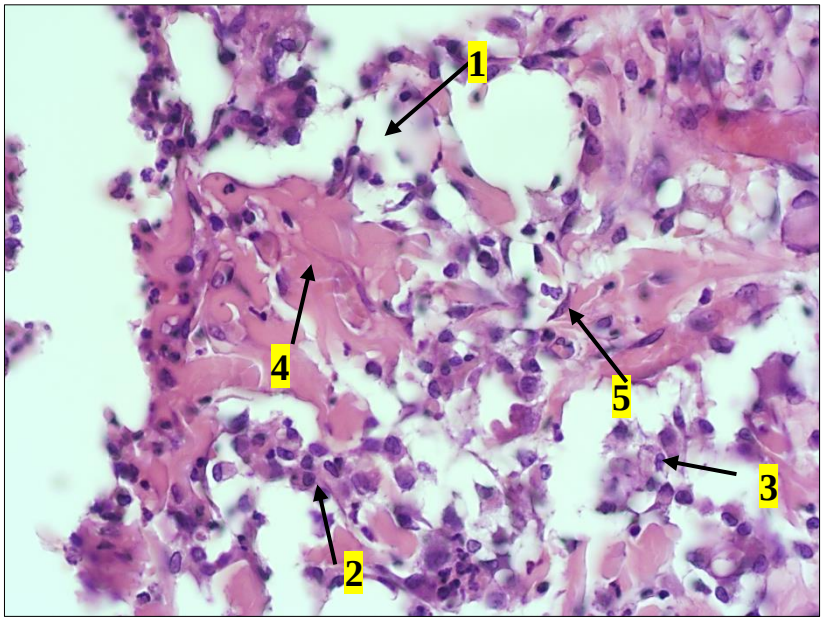
Примечание: Окраска гематоксилин-эозин.

а - увеличение х100. Струп на поверхности раны с наличием воспалительного экссудата (1), кровенаполнение, отек, воспалительная реакция под струпом (2);

б - увеличение х400. Воспалительная реакция (1), гистиоциты (2), коллагеновые волокна (3)

Рисунок 26 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (1% хлоргексидин) на 5 сутки

К 10 суткам сохраняется небольшой отек с наличием воспаления, смешанный характер которого обусловлен макрофагами и нейтрофилами. Здесь же набухшие фрагментированные коллагеновые волокна с фибробластами реактивного характера и умеренным отеком (Рисунок 27).



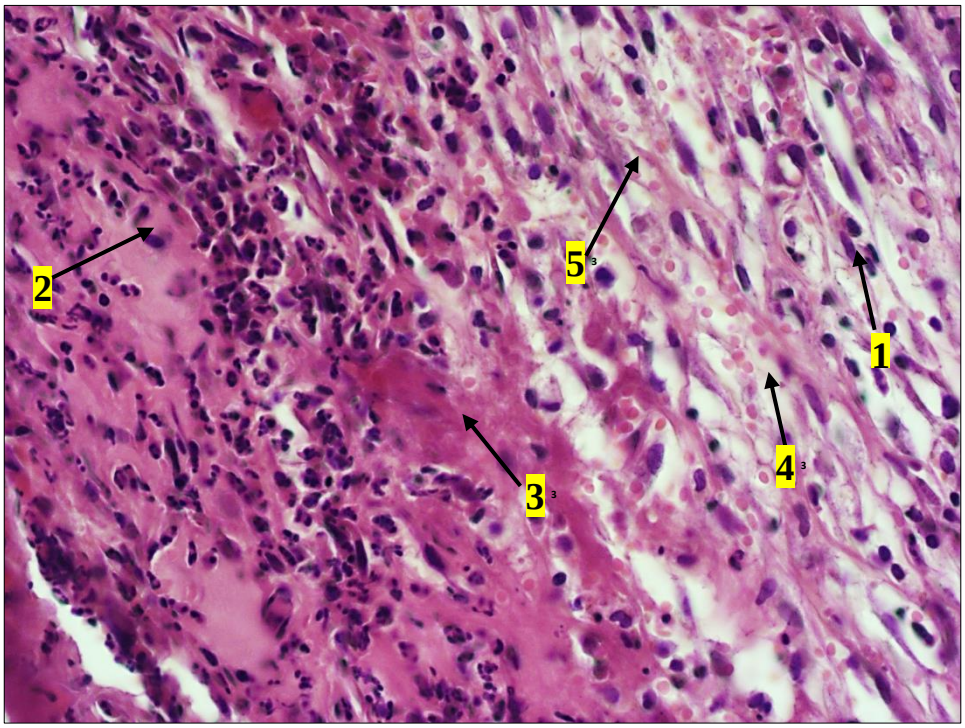
Примечание: Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение х100. Отек тканей (1), макрофаги (2), нейтрофилы (3), коллагеновые волокна (4), фибробласты (5)

Рисунок 27 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (1% хлоргексидин) на 10 сутки

По сравнению с 5 сутками на 10 сутки плотность воспалительного инфильтрата снизилась до 50,0±4,0 ($p<0,05$), нейтрофилов 46,8±3,5% ($p<0,05$). Количество лимфоцитов незначительно увеличило до 25,1±1,2% ($p>0,05$), плазматических клеток до 8,8±0,05%($p<0,001$), фибробластов 18,4±3,3% ($p>0,05$), макрофагов 0,9±0,02% ($p<0,001$), Число сосудов в 5 полях зрения выросло и составило 9,5±0,8 (абсолютное значение) ($p<0,001$).

На 20 сутки начинает уменьшаться отек тканей. На поверхности раны сохраняется струп, содержащий мертвые клетки, нейтрофилы. Под ним происходит снижение воспалительной реакции с формированием молодой грануляционной

ткани с образованием тонких нитей коллагеновых волокон, увеличением числа реактивных фибробластов с образованием новых сосудов лакунарного типа (Рисунок 28).

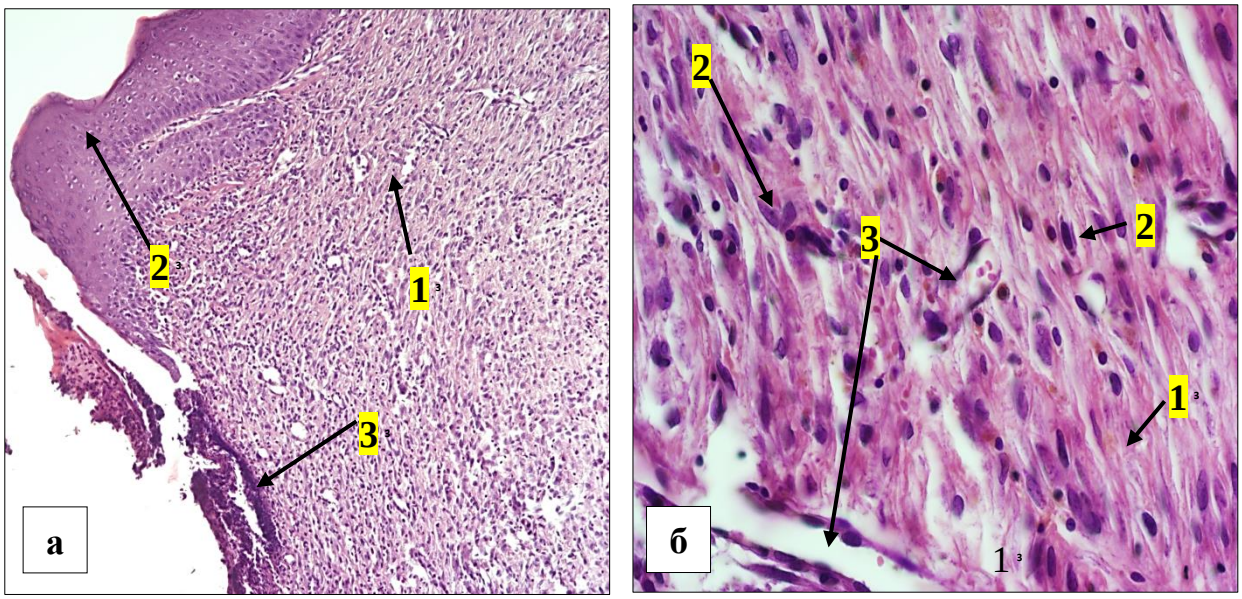


Примечание: Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение х400. Отек тканей (1), нейтрофилы (2), грануляционная ткань (3), нити коллагеновых волокон (4), реактивные фибробласты (5)

Рисунок 28 – Микрофото ожоговой раны группы с целлюлозой (1% хлоргексидин) на 20 сутки

При подсчете клеток плотность воспалительного инфильтрата по сравнению с 10 сутками также уменьшилась до 41,7±2,5 ($p<0,05$). При рассмотрении процентного состава клеток нейтрофилы снизились и составили 33,0±1,7 ($p<0,01$). Незначимо снизилось количество лимфоцитов до 20,7±2,1 ($p>0,05$). Отмечается достоверно значимый рост плазматических клеток до 11,8±0,05 ($p<0,001$), фибробластов до 31,5±2,7 ($p<0,01$), макрофагов до 2,0±0,01 ($p<0,001$). Число сосудов в 5 полях зрения значимо выросло до 14,6±0,2($p<0,001$). К окончанию эксперимента, на 28 сутки в этой группе наблюдается окончательное

формирование более зрелой грануляционной ткани с наличием вновь образованных кровеносных сосудов. Иногда на поверхности раны сохранялись небольшие фрагменты струпа. Во всех случаях была отмечена краевая эпителизация раны. Сохранялись небольшие участки воспалительной реакции, не глубоко, лишь в месте соприкосновения струпа с раневой поверхностью (Рисунок 29а). Увеличение плотно расположенных фибробластов и образование утолщенных коллагеновых волокон различной степени зрелости оказало большое влияние на формирование зрелой грануляционной ткани и регенерацию раны. Активное формирование кровеносных сосудов способствовало ускорению этого процесса. Воспаление было не выражено и представлено лишь единичными клетками (Рисунок 29б).



Примечание: Окраска гематоксилин-эозин.

а - увеличение х100. Грануляционная ткань с кровеносными сосудами (1), краевая эпителизация (2), воспалительная реакция (3)

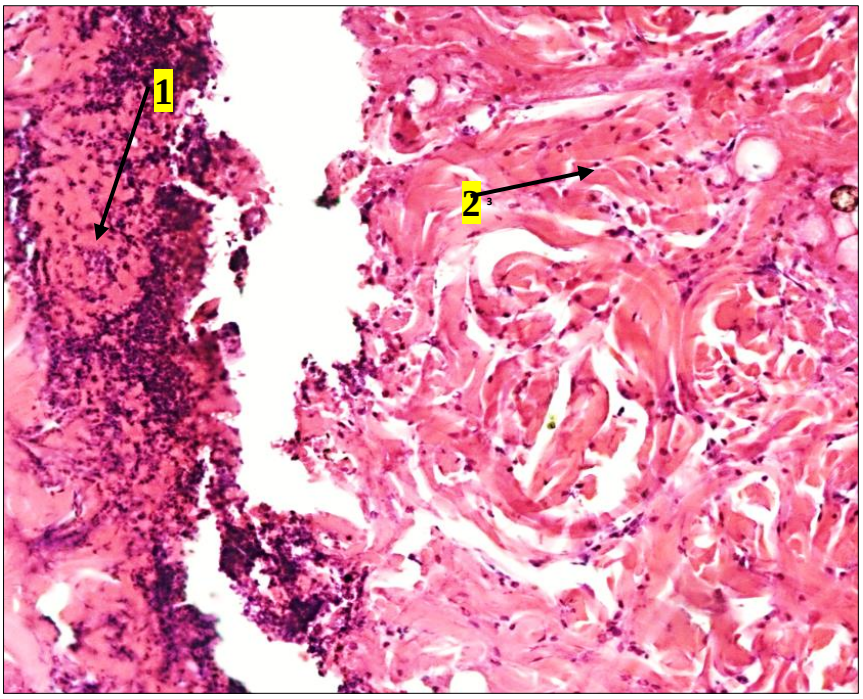
б - увеличение х400. Коллагеновые волокна (1), фибробласты (2), неососуды (3)

Рисунок 29 – Микрофото ожоговой раны группы с БЦ (1% хлоргексидин) на 28 сутки

По сравнению с 20 сутками плотность воспалительного инфильтрата при этом снизилась до 30,5±1,8 ($p<0,05$), количество нейтрофилов до 28,1±1,1% ($p<0,05$), лимфоцитов до 17,5±0,7% ($p>0,05$), плазматических клеток до 8,6±0,04% ($p<0,001$). В процессе наблюдения количество реактивных фибробластов увеличилось до 40,8 ±1,3% ($p<0,01$), макрофагов – 2,3±0,01% ($p<0,001$). Число сосудов в 5 полях зрения увеличилось и составило 15,2±0,4 в абсолютных цифрах. В итоге, к окончанию лечения по сравнению с 5 сутками плотность воспалительного инфильтрата уменьшилась на 45,1%, количество нейтрофилов снизилось на 49,6%, лимфоцитов на 24,6%. Количество плазмоцитов увеличилось на 83%, фибробластов на 60,5%, макрофагов на 70% и неососудов на 75%.

4.2.4 Патоморфологические изменения ожоговых ран в группе с использованием в лечении мази Левомеколь на 5, 10, 20, 28 сутки

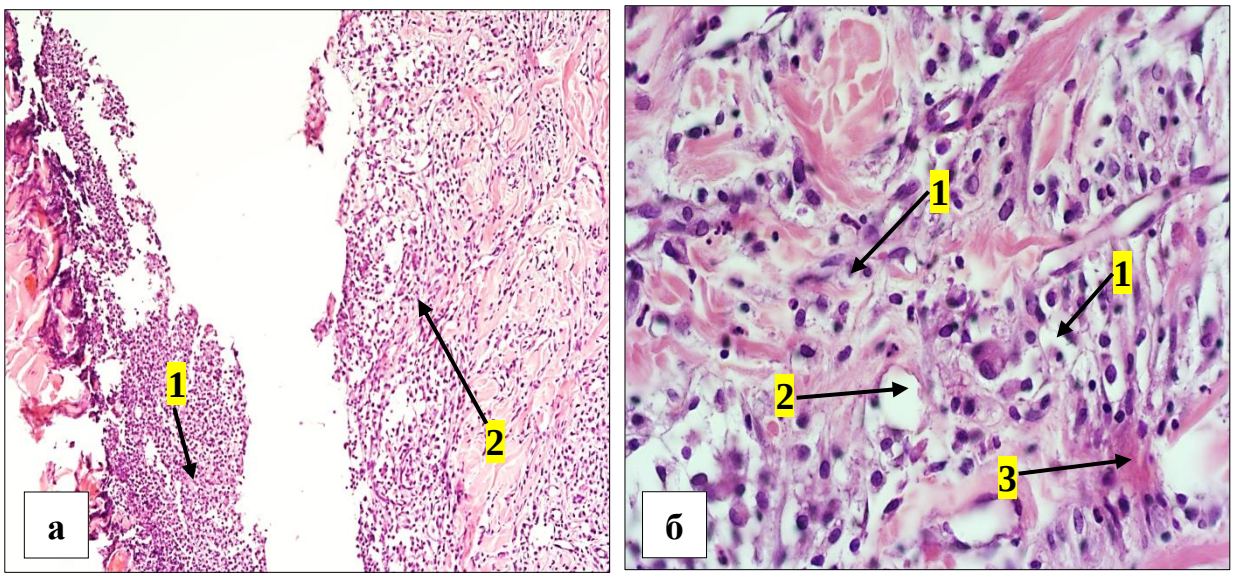
В контрольной группе крыс с открытым ведением ожоговых ран и применением в лечении мази Левомеколь на 5 сутки при патоморфологическом исследовании на поверхности раны регистрировались гнойно-некротические детритные массы с выраженной воспалительной реакцией (преимущественно нейтрофильной инфильтрацией) в глубоких слоях кожи, что свидетельствовало о более выраженном воспалении по сравнению с течением раневого процесса при использовании в лечении раневых покрытий на основе БЦ (Рисунок 30).



Примечание: Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение х400. Гнойно-некротический детрит (1), воспалительная реакция в глубоких слоях раны (2)

Рисунок 30 – Микрофото ожоговой раны группы с мазью Левомеколь на 5 сутки

Общая плотность воспалительного инфильтрата составила 56,4±1,7. При рассмотрении процентного состава клеток количество нейтрофилов составило 58,2±3,6%, лимфоцитов 21,7±1,0%, плазматических клеток 8,6±0,06%, фибробластов 10,6 ±1,1%, макрофагов 0,9±0,01%. Число сосудов составило 4,2±0,2. К 10 суткам происходит частичное отторжение гнойно-некротического детрита с поверхности раны (Рисунок 31а), однако в тканях сохраняется активная воспалительная реакция за счет лимфоцитов и макрофагов на фоне тканевого отека в дерме с минимальным формированием молодой грануляционной ткани (Рисунок 31б).



Примечание: Окраска гематоксилин-эозин.

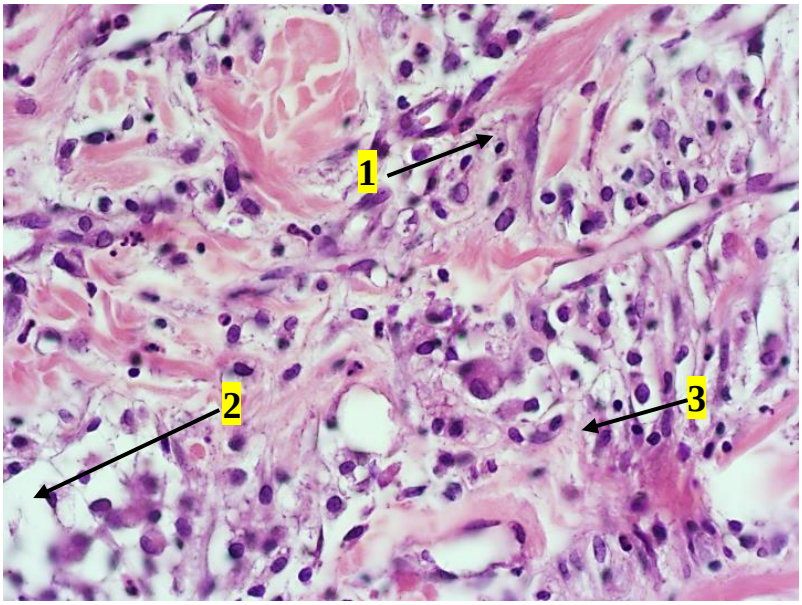
а - увеличение х100. Отторжение гнойно-некротического детрита (1), воспалительная реакция в глубоких слоях (2);

б - увеличение х400. Воспалительная инфильтрация преимущественно лимфоцитами и макрофагами (1), тканевой отек (2), грануляционная ткань (3) (б)

Рисунок 31 – Микрофото ожоговой раны группы с мазью Левомеколь на 10 сутки

По сравнению с 5 сутками общая плотность воспалительного инфильтрата на 10 сутки несколько снизилась, составив при этом 55,1±2,2, однако достоверно не изменилась ($p>0,05$). Не отмечена значимость различий при снижении количества нейтрофилов до 54,4±3,0%, лимфоцитов до 20,2±0,3%, макрофагов до 2,5±0,04% ($p>0,05$). Наряду с этим зарегистрировано достовернее увеличение плазматических клеток до 11,1±0,04% ($p<0,001$), числа вновь образованных сосудов до 7,6±0,5 ($p<0,001$). Однако, не отмечена значимость различий при увеличении фибробластов до 12,0±2,6% ($p>0,05$). На 20 сутки в препаратах кожи выражена воспалительная инфильтрация дермы преимущественно плазматическими клетками, лимфоцитами и макрофагами. Отмечается снижение тканевого отека и явления формирования молодой грануляционной ткани. Развитие рыхлой грануляционной ткани и созревание дермальных фибробластами происходит в

замедленном режиме. Сохраняется значительная макрофагальная и нейтрофильная воспалительная инфильтрация на фоне умеренного тканевого отека (Рисунок 32).

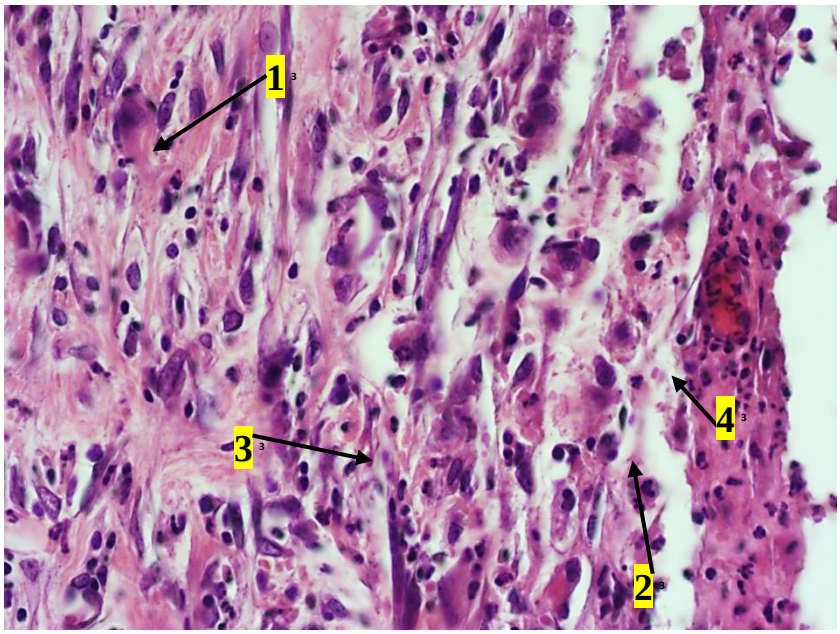


Примечание: Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение х 400. Реактивные фибробласты (1), отек тканей (2), инфильтрация вследствие воспаления (3)

Рисунок 32 – Микрофото раны животных 3 группы на 20 сутки

Воспалительная инфильтрация дермы преимущественно плазматическими клетками, лимфоцитами и макрофагами. По сравнению с 10 сутками плотность воспалительного инфильтрата снизилась до 45,7±4,1 ($p>0,05$); количество нейтрофилов 40,1±2,4% ($p<0,01$). Отмечалось значимое повышение процентного соотношения плазматических клеток до 13,8±0,02% ($p<0,001$), фибробластов до 18,6±1,3% ($p<0,05$), макрофагов до 5,8±0,04% ($p<0,001$), количество сосудов в 5 полях зрения до10,5±0,6 ($p<0,01$), не значимое увеличение лимфоцитов до 21,7±0,8% ($p>0,05$). На 28 сутки на месте ожога на поверхности раны отмечается сохранение детрита в виде тонкого струпа, под которым регистрируется медленное развитие незрелой грануляционной ткани с малым количеством реактивных фибробластов. На фоне снижения воспалительной инфильтрации в дерме сохраняется умеренная отечность, имеется среднее количество продольно расположенных эозинофильных коллагеновых волокон и реактивных

фибробластов, составляющие грануляционную ткань. Однако толщина этих коллагеновых волокон и плотность значительно меньше, чем в 1 и 2 группе. Также здесь более выражена нейтрофильная инфильтрация тканей и отек (Рисунок 33).



Примечание: Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение х 400. Коллагеновые волокна (1), отек тканей (2), инфильтрация вследствие воспаления (3), некротический детрит (4)

Рисунок 33 – Микрофото ожоговой раны 3 группы на 28 сутки

По сравнению с 20 сутками плотность воспалительного инфильтрата на 28 сутки снизилась до 38,5±1,9, однако достоверных различий выявлено не было ($p>0,05$). При рассмотрении процентного состава клеток количество нейтрофилов стало также меньше, составив 35,3±1,9%, уменьшилось и количество лимфоцитов до 20,1±0,7%, однако достоверных различий изменений этих клеток по сравнению с 20 сутками также выявлено не было ($p>0,05$). Значимость различий отмечена по снижению количество плазматических клеток до 10,5%±0,02% ($p<0,001$), увеличению фибробластов до 31,4±3,0% ($p<0,001$), макрофагов до 7,7±0,03% ($p<0,001$). Число вновь образованных сосудов увеличилось до 12,8±1,0, однако по сравнению с 20 сутками не изменилось (Таблица 7). В итоге, по сравнению с 5 сутками, к окончанию лечения плотность воспалительного инфильтрата снизилась

на 31,88%, количество нейтрофилов на 39,3%. Количество фибробластов увеличилось на 40,8%, плазмоцитов на 18,1%, макрофагов на 88,3%, неососудов на 67,2%.

Таким образом, при проведении морфометрических исследований было установлено, что, начиная с 5 суток и к окончанию лечения уменьшение воспалительного инфильтрата происходило в 1 (на 34,2%) и 2 группе (45,1%), тогда как в 3 группе он уменьшился на 31,8%. Снижение уровня нейтрофилов также более эффективно происходило в 1 (на 62,8%) и 2 группе (на 49,6%) по сравнению с 3 группой, где снижение составило 39,3%. Увеличение количество фибробластов также более значимо происходило в 1 (на 42,9%) и 2 группе (60,5%), а в 3 группе на 40,8%. К 28 суткам наблюдений количество образованных сосудов в 1 и 2 группе увеличилось на 72% и 75%, тогда как в группе сравнения на 67,2%.

Сравнительная характеристика процентного соотношения клеток воспаления, регенерации и сосудов при проведении морфометрических исследований представлена в таблицах 7-9.

Таблица 7 – Изменения процентного состава клеток в ранах при использовании в лечении раневого покрытия на основе БЦ (физиологический раствор)

Клетки ожоговой поверхности	БЦ (физиологический раствор)			
	5 сутки (1) M±m	10 сутки (2) M±m	20 сутки (3) M±m	28 сутки (4) M±m
Общий воспалительный инфильтрат	$52,4\pm2,6^{3,4}$	$53,0\pm3,1^{3,4}$	$41,7\pm1,8^{1,2,4}$	$34,5\pm2,8^{1,2,3}$
Нейтрофилы (%)	$59,6\pm2,2^{2,3,4}$	$50,9\pm1,8^{1,3,4}$	$38,4\pm3,5^{1,2,4}$	$22,2\pm2,7^{1,2,3}$
Лимфоциты (%)	$18,9\pm1,1^{4}$	$19,2\pm3,6$	$20,7\pm2,4^{4}$	$26,5\pm0,9^{1,3}$

Продолжение таблицы 7

Клетки ожоговой поверхности	БЦ (физиологический раствор)			
	5 сутки (1) M±m	10 сутки (2) M±m	20 сутки (3) M±m	28 сутки (4) M±m
Плазмоциты (%)	5,4±0,8[2,3,4]	8,4±0,3[1,3,4]	12,6±0,9[1,2,4]	13,5±0,5[1,2]
Фибробласты (%)	15,6±2,7[3,4]	19,7±4,1[4]	25,1±3,0[1]	33,1±1,3[1,2]
Макрофаги (%)	0,5±0,01[2,3,4]	1,8±0,03[1,3,4]	3,2±0,01[1,2,4]	5,7±0,04[1,2,3]
Сосуды в 5 полях зрения (абс)	3,5±0,3 [2,4]	7,2±1,1[1,3,4]	12,3±1,4[1,2]	12,5±0,8[1,2]
Примечание: 1- значимость различий (p<0,05) при сравнении с 5 сутками, 2 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 10 сутками, 3 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 20 сутками, 4 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 28 сутками				

Таблица 8 – Изменения процентного состава клеток в ранах при использовании в лечении раневого покрытия на основе БЦ+хлоргексидин

Клетки ожоговой поверхности	БЦ + хлоргексидин			
	5 сутки (1) M±m	10 сутки (2) M±m	20 сутки (3) M±m	28 сутки (4) M±m
Воспалительный инфильтрат	55,4±1,3[1,3,4]	50,0±2,0[1,3,4]	41,7±2,5[1,2,4]	30,5±1,8[1,2,3]
Нейтрофилы (%)	55,7±2,2[2,3,4]	46,8±3,5[1,3,4]	33,0±1,7[1,2,4]	28,1±1,1[1,2,3]

Продолжение таблицы 8

Клетки ожоговой поверхности	БЦ + хлоргексидин			
	5 сутки (1) M±m	10 сутки (2) M±m	20 сутки (3) M±m	28 сутки (4) M±m
Лимфоциты (%)	23,2±0,9	25,1±1,2[4]	20,7±2,1	17,5±0,7[2]
Плазмоциты (%)	4,7±0,03[2,3,4]	8,8±0,05[1,3,4]	11,8±0,05[1,2,4]	8,6±0,04[1,2,3]
Фибробласты (%)	16,1±1,8[3,4]	18,4±3,3[3,4]	31,5±2,7[1,2,4]	40,8±1,3[1,2,3]
Макрофаги (%)	0,3±0,01[2,3,4]	0,9±0,02[1,3,4]	2,0±0,01[1,2,4]	2,3±0,01[1,3,4]
Сосуды в 5 полях зрения (абс)	3,8±0,3[2,3,4]	9,5±0,8[1,3,4]	14,6±0,2[1,2,4]	15,2±0,2[1,2,3]
Примечание: 1- значимость различий (p<0,05) при сравнении с 5 сутками, 2 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 10 сутками, 3 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 20 сутками, 4 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 28 сутками				

Таблица 9 – Изменения процентного состава клеток в ранах при использовании в лечении мази Левомеколь

Клетки ожоговой поверхности	Мазь Левомеколь			
	5 сутки (1) M±m	10 сутки (2) M±m	20 сутки (3) M±m	28 сутки (4) M±m
Воспалительный инфильтрат	56,4±1,7[3,4]	55,1 ±2,2[4]	45,7±4,1[1]	38,5±1,9[1,2]
Нейтрофилы (%)	58,2±3,6[3]	54,4±3,0[3,4]	40,1±2,4[1,2]	35,3±1,9[1,2]
Лимфоциты (%)	21,7±1,0	20,2±0,3	21,7±0,8	20,1±0,7
Плазмоциты (%)	8,6±0,061[2, 3,4]	11,1±0,04[1, 3,4]	13,8±0,02[1, 2,4]	10,5±0,02[1, 2,3]
Фибробласты (%)	10,6±1,1[2,3, 4]	12,0±2,6[1,3, 4]	18,6±1,3[1,2, 4]	31,4±3,0[1,2, 3]
Макрофаги (%)	0,9±0,01[1,2, 3]	2,5±0,04[1,3. 4]	5,8±0,04[1,2, 4]	7,7±0,03[1,2, 3]
Сосуды в 5 полях зрения (абс)	4,2±0,2[1,2,3]	7,6±0,5[1,3,4]	10,5±0,6[1,2]	12,8±1,0[1,2]
Примечание: 1- значимость различий (p<0,05) при сравнении с 5 сутками, 2 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 10 сутками, 3 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 20 сутками, 4 - значимость различий (p<0,05) при сравнении с 28 сутками				

Полученные данные гистологических срезов на протяжении 28 суток наблюдений позволили нам сформировать 4 критерия, эффективности эпителизации раневых поверхностей после формирования глубоких ожогов:

1 критерий – минимальное скопление регенераторных клеток на раневой поверхности, отсутствие элементов грануляции, нет признаков эпителизации раны;

2 критерий – грануляционная ткань в ране тонкая и незрелая, преобладают клетки воспаления (нейтрофилы, лейкоциты), имеется небольшое количество капилляров, фибробластов, скопление коллагеновых волокон незначительно, количество эпителиальных структур минимально;

3 критерий – грануляционная ткань ран имеет средний объем, в ней преобладают реактивные фибробласты, имеются признаки усиления ангиогенеза и неоваскуляризации, наблюдается умеренное наполнение ран коллагеновыми волокнами, эпителизация умеренно выражена;

4 критерий – грануляционная ткань ран состоит из большого количества фибробластов с массивным скоплением коллагеновых волокон, отчетливыми признаками образования новых сосудов, с полным или частичным заживлением раны, клетки, участвующих в процессах эпителизации представлены в большом количестве. На основе этих критериев и была проведена оценка скорости эпителизации ожоговых ран в трех группах экспериментальных животных.

Таким образом, патоморфологические исследования показали, что в формировании ожогового струпа участвуют некротические элементы эпидермиса и верхних слоев дермы вследствие их расплавления, а также набухшие коллагеновые волокон и разрушенные фибробласты. При этом в ранах присутствует плотная диффузная инфильтрация глубоких слоев кожи воспалительными элементами, в основном нейтрофилами, лимфоцитами. Наряду с этим регистрируется дилатация мелких кровеносных сосудов, не содержащих агрегатов тромбоцитов и эритроцитов. На 5 сутки при использовании в лечении влажных целлюлозных пленок отмечалось их пропитывание раневым экссудатом с набуханием в месте соприкосновения с раневой поверхностью. В итоге при высыхании этих материалов через 3-5 суток над раной формировался плотный струпа, что и обеспечивало первый критерий заживления.

Открытое ведение ожоговых ран в 3 группе животных с помощью мазевых повязок на водорастворимой основе характеризовалось более выраженными патоморфологическими воспалительными изменениями, обусловленными за счет

инфильтрации тканей лейкоцитами. В первой и второй группах с использованием целлюлозных покрытий эти изменения были выражены значительно меньше, начиная с середины лечения и далее на 10,15 и 20 сутки. Закрытая среда, за счет образованной с добавлением целлюлозного материала плотной корки, позволяет создать барьер и уменьшить бактериальную контаминацию раневых поверхностей. В группах с применением раневых биопленок на основе биоцеллюлозных мембран к 28 суткам постожогового периода наблюдается более ускоренное формирование значительного объёма грануляционной ткани, за счет роста фибробластов и тонких коллагеновых волокон, в отличие от животных 3 группы, где эти процессы протекали в замедленном темпе. Наряду с этим появляется большое количество тонкостенных гемокапилляров синусоидного типа ($p<0,05$), что свидетельствует о активации процессов неоваскуляризации раны. В этой связи процессы ускорения реэпителизации раны лучше идут в закрытых условиях, создаваемые целлюлозными материалами, биопленки которых способны стимулировать процессы миграции и пролифирации эндотелиальных клеток, а также активировать факторы образования сосудистого эндотелия. Согласно 2 и 3 критерию заживления ран у животных обеих экспериментальных групп имелась наибольшая площадь грануляционных клеточных структур, по сравнению с 3 контрольной группой. Кроме того, в элементах грануляций в 45% случаев регистрировались клетки Пирогова-Лангханса и многоядерные клетки по типу «инородных тел». Раневые поверхности крыс 1 и 2 группы на 20, 28 сутки экспериментальных исследований характеризовались хорошим, в основном полным заживлением кожного дефекта. У 18 (90%) из 20 крыс этих групп состояние ран соответствовало 4 критерию заживления, где отмечался большой обьем грануляционной ткани и полная эпителизация раневых дефектов. Эти раны отличала хорошая сформированность за счет плотного расположения коллагеновых волокон, находящихся в разной степени зрелости, а также за счет появления большого количества фибробластов и кровеносных сосудов. При этом отмечается снижение нейтрофильной инфильтрации свидетельствующее о снижении воспалительного процесса. Однако

у 6 (60%) в этот период раны крыс 3 группы соответствовали 2, 3 критерию заживления, что соответствовало начальным или средним признакам репарации. Грануляционная ткань на раневой поверхности была малого или среднего объёма, количество капилляров, фибробластов было небольшим. В ране преобладали умеренное количество воспалительных клеток, представленных нейтрофилами и макрофагами. Полная эпителизация регистрировалась только лишь в 4 (40%) случаев. Стоит констатировать, что смешанное воспаление, преимущественно нейтрофильное и лимфоцитарное, сохранялась во всех группах животных в течение первых 10 суток. Благодаря микрофибриллярной основе воспалительный экссудат пропитывал целлюлозу с ее последующим набуханием и изменением цвета. Поэтому воспаление было выражено меньше. К 20 суткам в группах с использованием целлюлозных пленок представленных, как в изотоническом растворе, так и с антисептиком отмечалось более быстрое снижение воспаления с появлением гистиоцитов и лишь плазматические клетки и макрофаги наблюдались в незначительных количествах. На этом фоне продолжается снижение отека подлежащих дермальных элементов. Появляющаяся молодая грануляционная ткань была уже в большом количестве. Образующиеся фибробласты начинают располагаться, как на раневой поверхности, так и мигрировать в целлюлозные волокна. Эти механизмы при сравнительном изучении наблюдались интенсивнее в основных группах. При сравнении 1 и 2 группы между собой отмечено, что патоморфологические процессы заживления в них были практически одинаковыми. Однако при сравнении критериев эффективности заживления раневых поверхностей основных групп с 3 группой имелась значимость различий (Таблица 10). Достоверность различий в сравнении между 1 и 3, 2 и 3 группами ($p<0,05$) отмечается по 4 критерию заживления. Это подтверждается значительно большим количеством заживших ран к окончанию лечения в основных группах. По 2 и 3 критерию заживления достоверно лучшая частота ($p<0,05$) эпителизированных ран также отмечается в основных группах животных.

Таблица 10 – Сравнение динамики заживления экспериментальных ожоговых ран в 3 группах по 4 патоморфологическим критериям заживления

Группы	4 критерия заживления			
	Критерий 1 (5 сутки) n (%)	Критерий 2 (15 сутки) n (%)	Критерий 3 (20 сутки) n (%)	Критерий 4 (28 сутки) n (%)
1 (n = 20)	- (0)	4 (80)	5 (100)	5 (100)
2 (n = 20)	- (0)	3 (60)	4 (80)	4 (80)
3 (n = 20)	- (0)	1 (20)	2 (40)	2 (40)
Примечание: 1 – первые признаки заживления, 2 – минимальные процессы эпителизации, 3 – умеренный обьем грануляционной ткани, признаки неоваскуляризации и начальной эпителизации, 4 – большой обьем грануляционной ткани, достигнутое заживление				

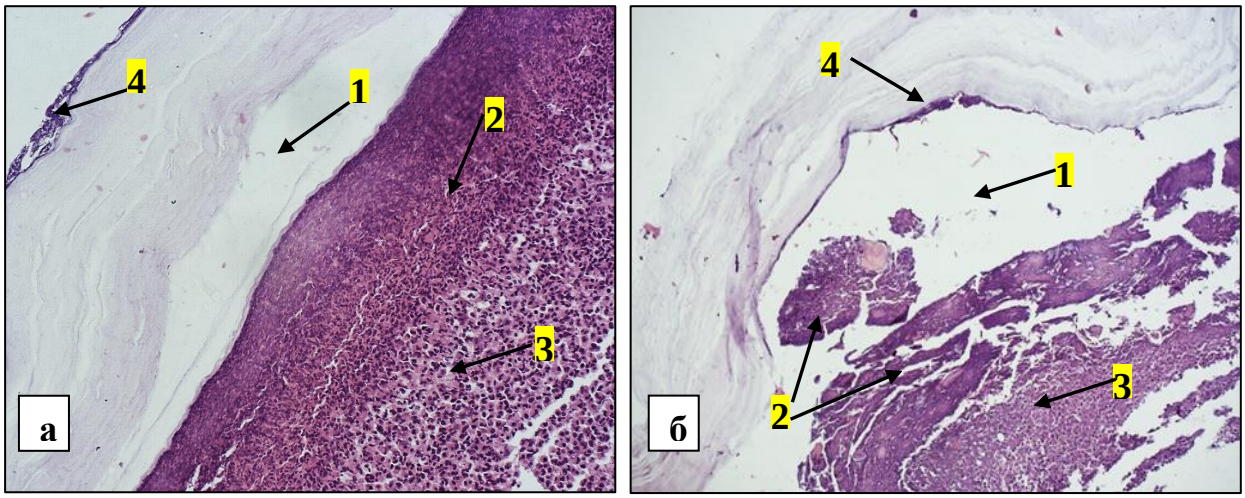
Достижение каркасных свойствах повязок с помощью высыхания целлюлозной пленки влияет на обеспечение герметичности раневой поверхности. Длительное нахождение материала на месте позволяет в закрытых условиях добиваться более плавного заживления раны, без вмешательства в последовательные процессы регенерации и не травмируя образующиеся новые клеточные элементы. Действительно, нами установлено, что нет разницы при использовании целлюлозных биопленок, находящихся в изотоническом растворе и с адсорбцией в 1% растворе хлоргексидина. По-видимому, это связано с малым накоплением антисептика в БЦ.

Обсуждая итоги лечения и патоморфологические изменения можно констатировать, что в 3 группе с использованием традиционного подхода с ежедневными мазевыми перевязками эпителизация ран к 28 суткам произошла в 40% случаев, тогда как в 1 и 2 группе с применением новых биоматериалов в эти сроки в 90% наблюдений репарация ожоговых ран соответствовала стадиям частичной или полной эпителизации.

Длительно существующая закрытая раневая среда, формируемая раневыми целлюлозными покрытиями, повышает эффективность заживления ран и предполагает отказ от частых ежедневных перевязок, в результате которых на раневой поверхности подвергаются травматизации образующиеся не зрелые клеточные структуры в виде фибробластов и коллагена, а также молодая грануляционная ткань.

Клинические исследования

Было апробировано использование биопленок на основе бакцеллюлозы у 5 пациентов с инфицированными ранами мягких тканей нижних конечностей различного генеза в течение 4-5 суток с дальнейшим патоморфологическим исследованием, как ран, так и самой БЦ. Особенности структуры целлюлозных биопленок состоят в том, что они адсорбируют между волокнами микрофибрилл воспалительную отечную жидкость и экссудат, снижая проявления отека тканей. При проведении морфологических исследований в первые 3 суток нахождения целлюлозной биопленки в ране на фоне значительной бактериальной контаминации присутствует инфильтративная фаза воспаления (Рисунок 34 а).

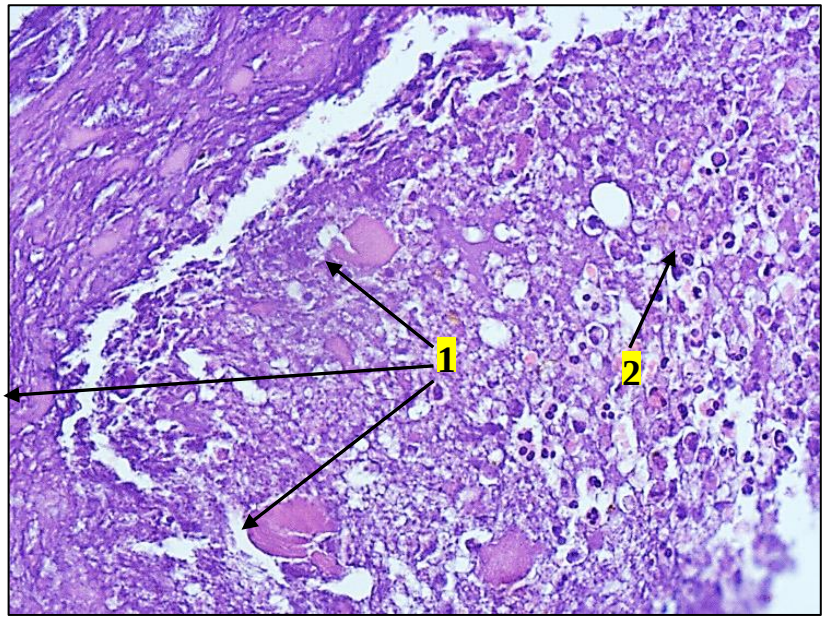


Примечание: Окраска гематоксилин-эозин, а – увеличение 10х10, б – увеличение 10х20. Отек ткани (1), лейкоцитарная инфильтрация (2), сегментоядерные нейтрофилы обычного строения (3), воспалительная инфильтрация целлюлозы (4)

Рисунок 34 – Фрагмент целлюлозной пленки на 3 сутки нахождения в ране

В дальнейшем, поверхность высохшего материала, по сути являющегося инородным телом, покрывается детритными массами, состоящими из разрушенной массы лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов (Рисунок 34 б).

Если в ране преобладал значительный гнойно - воспалительного процесс то мы наблюдали лизис и ускоренную фрагментацию бактериальной целлюлозы. Особе влияние на это оказывали повышенное гнойное отделяемое из раны вследствие экссудации и микробного обсеменения, быстрое разрушение лейкоцитов с формированием детритных масс (Рисунок 35).

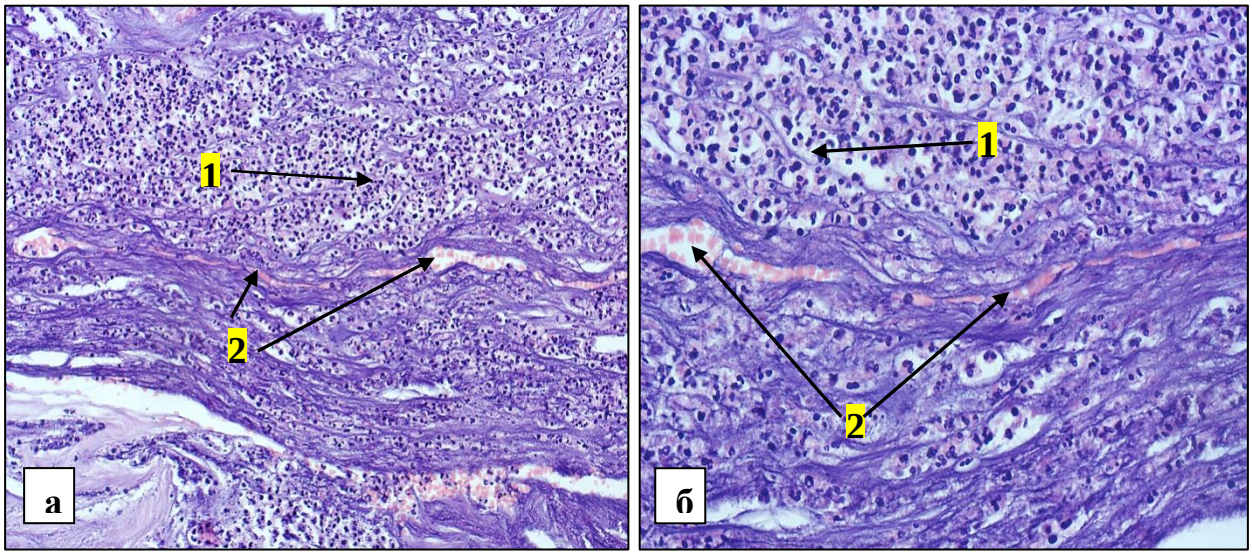


Примечание: Окраска гематоксилин-эозин, увеличение 10х40. Фрагменты материала (1), нейтрофильные лейкоциты (2)

Рисунок 35 – Фрагментация биоцеллюлозной пленки

Снижение бактериальной контаминации, уменьшение гнойной экссудации позволяло целлюлозным пленкам находиться в ране более длительный срок, в среднем около 6-8 суток. Низкое воспаление способствовало более тесному контакту раневой поверхности и целлюлозы, который обеспечивался механизмом прилипания, с последующим образованием на границе материала и раны

сосудистых «щелей», с отсутствующим эндотелиальным слоем на фоне умеренной нейтрофильной лейкоцитарной инфильтрации (Рисунок 36а). В указанных пространствах находились эритроциты, лейкоциты, то есть наблюдается медленное формирование не зрелых сосудов «лакунарного» типа (Рисунок 36б), что в итоге обеспечивает новую васкуляризацию раневой поверхности.



Примечание: Окраска гематоксилин-эозин, а - увеличение 10х40, б - увеличение 10х60. Лейкоцитарная инфильтрация (1), сосудистые щели «лакунарного» типа (2)

Рисунок 36 – Целлюлозная пластина, находящаяся в ране 7 суток

В клинике, у пациентов с длительно незаживающими ранами применение целлюлозных биоповязок показало свою эффективность. На фоне уменьшения количества перевязок и по сравнению с традиционным лечением было зарегистрировано более быстрое заживление ран, а пациенты отметили значительное снижение болевого синдрома и экссудацию ран.

4.3 Динамика лабораторных показателей крови при лечении экспериментальных ожоговых ран с помощью раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы

Оценка показателей в группах развернутого анализа крови на 5 сутки периода формирования раны вследствие ожога показала, что количество эритроцитов в основных группах, в группе сравнения (Таблица 11) были выше значений в контрольной группе и более значимо выражены в 1 группе ($p_{контр}$=0,037), достигая 7,6х10^9, 8,1х10^{12}/л и 7,9х10^{12}/л. На 10 сутки отмечена тенденция их к повышению на 18,3% (9,3х10^{12}/л) в группе БЦ+физраствор ($p_{инт}$=0,012, $p_{контр}$=0,037), на 11,3% (9,1х10^{12}/л) в группе БЦ+хлоргексидин ($p_{инт}$=0,012, $p_{контр}$=0,037) и на 8,1% (8,6х10^{12}/л) в группе с Левомколем ($p_{инт}$=0,012, $p_{контр}$=0,037). На 20 сутки отмечено снижение количества эритроцитов в 1 группе на 10,8% (9,3х10^{12}/л, $p_{контр}$=0,037), во 2 группе на 11% (9,3х10^{12}/л, $p_{инт}$=0,012, $p_{контр}$=0,037), тогда как в 3 группе отмечалось некоторое увеличение эритроцитов на 8,5% (9,4х10^{12}/л, $p_{инт}$=0,012, $p_{контр}$=0,037). К 28 суткам происходит снижение количества эритроцитов в 1 группе на 7% до 7,8х10^{12}/л ($p_{контр}$=0,037), во второй группе он практически не изменился, составив 8,2х10^{12}/л, тогда как в третьей его снижение произошло значимо на 20,2% ($p_{хлор}$ =0,021, $p_{физ}$=0,011), составив 7,5х10^{12}/л.

Аналогичная тенденция отмечена с уровнем гематокрита. На 5 сутки исследований его значения были выше контроля, приближаясь к показателям интактных животных. На 10 сутки отмечается его рост, более выраженный в 1 и 2 группе. Так, в группе БЦ+физраствор он увеличился на 11,6% (42,1%, $p_{инт}$=0,012, $p_{контр}$=0,037), в группе БЦ+хлдоргексидин на 12,9% (42,1%, $p_{инт}$=0,028, $p_{контр}$=0,037). В группе с мазью Левомеколь достоверного роста этого показателя не отмечено (39,2%, $p_{контр}$=0,037). К 20 суткам происходит снижение гематокрита в 1 группе на 4,3% (40,3%, $p_{контр}$=0,037), во второй группе на 4% (40,4%, $p_{контр}$=0,037), тогда как в 3 группе продолжился его рост на 10,5% (43,8%, $p_{контр}$=0,037). К окончанию исследования в группах продолжается снижение гематокрита, уровень которого приближается к контрольным значениям. В группе БЦ+физраствор снижение

произошло на 9,4% (36,5%, $p_{контр}$=0,037), в группе БЦ+хлоргексидин на 2% (39,6%) и в группе с мазью Левомеколь на 17,7% (36,5%). На 5 сутки наблюдений во всех трех группах отмечался умеренно повышенный уровень гемоглобина, по сравнению с контролем, от 138 до 145 г/л. На 10 сутки отмечается его рост на 10,9% в 1 группе (156 г/л, $p_{контр}$=0,037, $p_{инт}$=0,012), на 10,4% во второй группе (154 г/л, $p_{контр}$=0,037), а в 3 группе на 2,7% (149 г/л, $p_{контр}$=0,037). На 20 сутки в 1 и 2 группе происходит некоторое незначительное снижение уровня гемоглобина (153 и 150 г/л), значение которого по-прежнему остается выше показателей контрольной группы ($p_{контр}$=0,037), а в 3 группе наблюдается рост этого показателя на 10,2% (166 г/л). К окончанию исследования в 1 и 2 группе отмечается снижение гемоглобина на 11,8% (135 г/л, $p_{контр}$=0,037) и 4,7% (143 г/л) соответственно, а в группе с Левомеколем на 21,7%, достигая 130 г/л.

Высокий уровень тромбоцитов во всех 3 группах животных по сравнению с контрольной группой был зарегистрирован на протяжении всех 28 суток ($659x10^9$, $834x10^9$ и $707x10^9$, $p_{контр}$=0,037). Снижение этого показателя отмечается, начиная с 20 суток. По сравнению с 5 сутками в 1 группе он уменьшился на 50,8%, во второй группе на 23,4% и в третьей на 34,2%. К 28 суткам в 1 и 2 группе отмечается рост уровня тромбоцитов по сравнению с 20 сутками. В группе БЦ+физраствор он составил 41% ($549x10^9$), в группе БЦ+хлоргексидин – 20,6% ($805x10^9$), а в группе с мазью Левомеколь наоборот отмечено падение на 20% ($324x10^9$), что также ниже интактной группы ($688x10^9$, $p_{инт}$=0,020). Наличие лейкоцитоза не сопровождало течение раневого процесса у животных все 3 экспериментальных групп. Их некоторое повышение на 10 сутки зарегистрировано у всех по сравнению с контролем (1 группа, $6,3x10^9$ – на 34,4%; 2 группа, $5,3x10^9$ – на 24,5%; 3 группа, $5,0x10^9$ – на 22%. К 28-м суткам эксперимента по сравнению с 10 сутками в 1 и 2 группе отмечали значимое снижение показателей лейкоцитов: 1 группа, $4,9x10^9$ – на 23,5%, 2 группа, $4,5x10^9$ – на 15,1%, однако в 3 группе наоборот отмечено их повышение на 26,5% до $6,8x10^9$ ($p<0,001$).

Таблица 11 – Динамика основных показателей периферической крови в группах экспериментальных животных в течение 28 суток наблюдений

Группы	**Лейкоциты, 10*9/л** Me (Q1; Q3)	**Эритроциты, 10*12/л** Me (Q1; Q3)	**Гемоглобин, г/л** Me (Q1; Q3)	**Гематокрит, %** Me (Q1; Q3)	**Тромбоциты, 10*9/л** Me (Q1; Q3)
Интактные	6,2 (3,2;6,6)	7,4 (7,3;7,4)	140 (128;141)	37,0(34,6;37,1)	688 (652;694)
Контроль	3,4 (1,1;3,5)	6,2 (1,8;6,2) $p_{инт}$=0,036	108 (31;110) $p_{инт}$=0,037	28,3 (8,3;28,6) $p_{инт}$=0,037	102 (99;143) $p_{инт}$=0,037
5 сутки					
1 группа БЦ + физраствор	4,2 (4,0;6,8)	7,6 (7,1;8,4) $p_{контр}$=0,037	139 (138;147) $p_{контр}$=0,037	37,2(35,8;39,3) $p_{контр}$=0,037	659(657;826) $p_{контр}$=0,037
2 группа БЦ + хлоргексидин	4,0 (4,0;6,6) $p_{контр}$=0,036	8,1 (6,7;8,2)	138 (136;157)	37,0(34,5;38,5)	834(815;840) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037
3 группа Левомеколь	3,9 (3,7;4,6)	7,9 (7,4;8,5)	145 (136;150)	39,5(37,4;40,4)	707(661;781) $p_{контр}$=0,037
10 сутки					
1 группа БЦ + физраствор	6,4 (4,4;6,5) $p_{контр}$=0,037	9,3 (8,5;9,6) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037	156 (147;159) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,036	42,1(41,1;44,2) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037	700 (684;846) $p_{контр}$=0,037
2 группа БЦ + хлоргексидин	5,3 (3,2;5,6)	9,1 (8,0;9,7) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037	154 (147;171) $p_{контр}$=0,037	42,1(39,4;46,4) $p_{инт}$=0,028 $p_{контр}$=0,037	647 (517;758) $p_{контр}$=0,037
3 группа Левомеколь	5,0 (4,3;5,5) $p_{контр}$=0,037	8,6 (7,8;8,8) $p_{инт}$=0,021 $p_{контр}$=0,037	149 (141;153) $p_{контр}$=0,037	39,2(37,0;40,7) $p_{контр}$=0,037	621 (578;735) $p_{контр}$=0,037
20 сутки					
1 группа БЦ + физраствор	6,3 (5,6;7,4)	8,3 (8,1;9,3) $p_{контр}$=0,037	153 (148;159) $p_{контр}$=0,037	40,3(40,1;42,4) $p_{контр}$=0,037	324 (259;593)
2 группа БЦ + хлоргексидин	4,8 (2,8;6,7)	8,1 (7,7;8,8) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037	150 (142;156) $p_{контр}$=0,037	40,4(36,8;41,2) $p_{контр}$=0,037	639 (581;834) $p_{контр}$=0,037
1 группа Левомеколь	4,0 (4,0;4,7)	9,4 (8,3;9,7) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037	166 (147;170) $p_{контр}$=0,037	43,8(39,7;44,6) $p_{контр}$=0,037	465 (375;635) $p_{контр}$=0,037 $p_{лев}$=0,030

Продолжение таблицы 11

28 сутки					
1 группа БЦ + физраствор	4,9 (3,3;5,0)	7,8 (7,4;10,1) $p_{контр}$=0,037	135 (128;169) $p_{контр}$=0,037	36,5(35,9;45,8) $p_{контр}$=0,037	549 (316;624) $p_{контр}$=0,037
2 группа БЦ + хлоргексидин	4,5 (2,1;6,4)	8,2 (7,5;8,9) $p_{инт}$=0,037	143 (136;148)	39,6(37,5;41,2)	805 (701;903)
3 группа Левомеколь	6,8 (4,0;7,0)	7,5 (6,7;7,9) $P_{хлор}$ =0,037 $P_{физ}$=0,037	130 (111;135) $p_{бц+хг}$=0,037 $p_{бц+фр}$=0,020	36,5(31,0;38,0)	372 (104;586) $p_{инт}$=0,020 $p_{бц+хг}$=0,037 $p_{бц+фр}$=0,020
Примечание: p<0,05 – значимость различий между группами					

При исследовании основных биохимических констант крови (Таблица 12) в течение всего периода наблюдений достоверно значимых изменений уровня креатинина не наблюдалось. Максимальный уровень его в 1 группе достигал 64,5 мкмоль/л (10 сутки), во 2 группе – 62,1 мкмоль/л (5 сутки), в 3 группе – 62,1 мкмоль/л (20 сутки). Уровень глюкозы на 5 сутки был достоверно ниже по сравнению с контролем на 15,6% в группе БЦ+физраствор (8,1 мколь/л, $p_{контр}$=0,037) и на 16,7% в группе БЦ+хлоргексидин (8,0 ммоль/л, $p_{контр}$=0,037), на 18,8% в группе с мазью Левомеколь (7,8 ммоль/л). На 10 сутки достоверно низкий уровень глюкозы на отмечен только группе БЦ+физраствор по сравнению с контролем на 29,2% (6,8 ммоль/л, $p_{контр}$=0,037), тогда как в группе с Левомеколем наоборот отмечено повышение уровня глюкозы на 22,6% ($p_{конт}$=0,012), содержание которого достигало 12,4 ммоль/л. По сравнению с 10 сутками на 20 сутки содержание глюкозы увеличивается в 1 и 2 группе (1 группа – на 32%, 10,0 ммоль/л; 2 группа – на 19,9%, 9,5 ммоль/л) при снижении в группе с Левомеколем на 21,8% (9,7 ммоль/л), но значимых различий с контролем и между группами не отмечено (p>0,05). К 28 суткам уровень глюкозы снижается, составляя в группах в среднем 8,7 ммоль, 8,8 ммоль/л и 9,0 ммоль/л, однако также значимости различий выявлено не было (p>0,05).

На 5 сутки в группе БЦ+физраствор уровень общего белка был ниже на 14,8% (56,2 г/л) по сравнению с интактной группой ($p_{инт}$=0,012) и на 17,4% с группой БЦ+хлоргексин ($p_{контр}$=0,037) (Таблица 12).

Таблица 12 – Динамика ряда биохимических показателей крови групп экспериментальных животных в контроле и на 5, 10, 20, 28 сутки

Группа	**Креатинин, мкмоль/л** Me (Q1; Q3)	**Глюкоза, ммоль/л** Me (Q1; Q3)	**Общий белок, г/л** Me (Q1; Q3)	**АСТ, Ед/л** Me (Q1; Q3**)**	**АЛТ, Ед/л** Me (Q1; Q3)
Интактные	52,2 (52,2:57,2)	9,1 (8,9;9,1)	66,0 (65,5;66,0)	5,5(3,5;5,8)	65,0 (64,0;65,2)
Контроль	59,6 (55,9;62,1)	9,6 (9,6;9,8)	54,0 (53,9;59,2) $p_{инт}$=0,036	45,9(45,1;46,9) $p_{инт}$=0,037	72,1 (41,0;72,1)
5 сутки					
1 группа БЦ + физ-раствор	52,2 (51,2;54,7)	8,1 (7,1;8,7) $p_{инт}$=0,016 $p_{контр}$=0,037	56,2 (54,6;58,4) $p_{инт}$=0,012 $p_{ц+хл}$=0,037	36,2(34,6;50,1) $P_{инт}$=0,037	49,3 (48,9;60,1)
2 группа БЦ + хлоргекси-дин	62,1 (59,6;75,6)	8,0 (7,6;9,0) $p_{контр}$=0,037	68,0 (61,5;68,5)	14,5(2,5;34,3) $p_{лев}$=0,037	50,3 (23,3;51,7) $p_{инт}$=0,012
3 группа Левоме-коль	57,2 (57,2;60,8)	7,8 (7,7;9,9)	56,9 (56,1;62,6)	59,6(58,6;62,6) $P_{инт}$=0,037	52,7 (44,4;53,0) $p_{инт}$=0,037
10 сутки					
1 группа БЦ +физ-раствор	64,5 (54,7;65,8)	6,8 (6,7;7,0) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037 $p_{лев}$=0,012	66,5 (65,8;67,7) $p_{контр}$=0,037	64,4(40,3;70,4) $P_{инт}$=0,037	45,6 (42,7;53,9) $p_{инт}$=0,037
2 группа БЦ + хлоргекси-дин	54,7 (48,6;58,4)	7,7 (6,5;9,4)	64,4 (60,0;71,6)	58,6(58,1;63,4) $p_{инт}$=0,012 $p_{контр}$=0,037 $p_{лев}$=0,012	55,2 (53,0;69,6)
3 группа Левоме-коль	58,4 (57,2;59,6)	12,4(9,0;12,6) $p_{контр}$=0,012	62,2 (59,1;63,1)	37,6 (35,8;53,6) $P_{инт}$=0,037	60,8 (57,4;68,4)

Продолжение таблицы 12

20 сутки					
1 группа БЦ + физ-раствор	58,4 (52,2;58,4)	10,0(8,3;11,4)	62,8 (59,9;64,1) $p_{контр}$=0,037	19,0 (0,8;23,3)	97,1 (29,9;99,1)
2 группа БЦ + хлоргекси-дин	53,5 (53,5;58,4)	9,5 (9,0;9,7)	61,3 (60,8;62,3)	51,4 (26,6;60,1) $P_{инт}$=0,037	67,7 (62,0;78,2) $p_{лев}$=0,046
3 группа Левоме-коль	62,1 (55,9;65,8)	9,7 (9,3;11,2)	67,0 (63,1;67,2) $p_{контр}$=0,037	32,3 (21,1;40,6)	44,6 (43,2;59,3) $p_{инт}$=0,012
28 сутки					
1 группа БЦ + физ-раствор	59,6 (58,4;69,5)	8,7 (8,6;9,5)	59,9 (58,0;65,3)	26,6 (20,5;27,8) $p_{контр}$=0,012 $p_{инт}$=0,037	47,1 (32,9;49,0) $p_{инт}$=0,012 $p_{лев}$=0,020
2группа БЦ + хлоргексид ин	57,8 (51,0;70,1)	8,8 (8,2;9,6)	71,4 (68,2;72,8) $p_{инт}$=0,037	25,1 (9,8;36,7) $p_{инт}$=0,020	49,2 (28,3;60,5) $p_{инт}$=0,020
3 группа Левоме-коль	54,7 (51,6;58,4)	9,0 (8,1;9,7)	60,7 (59,9;64,2)	37,5 (29,3;44,9) $p_{бц+хг}$=0,020 $p_{бц+фр}$=0,020	67,2 (62,9;73,1) $p_{инт}$=0,037 $p_{бц+хг}$=0,020 $p_{бц+фр}$=0,035
Примечание: p<0,05 – значимость различий между группами					

К 10 суткам по сравнению с 5 сутками в группе БЦ+физраствор имеется достоверное повышение уровня общего до 66,5г/л на 15,5%, значимость различий которого наблюдается только по сравнению с контролем ($p_{контр}$=0,037). В этот период в группе БЦ+хлоргексидин его уровень снизился на 5,3% (64,4 г/л, p>0,05), а в группе с Левомеколем рост общего белка составил 8,5% (62,6 г/л). На 20 сутки тенденция к снижению общего белка в 1 и 2 группе сохраняется и отмечается увеличением его количества на 8,2% в 3 группе, однако значимых различий между группами не выявлено. Наибольшее повышение уровня общего белка прослежено на 28 сутки в группе БЦ+хлоргексидин, где он достигает 71,4 г/л, что на 7,6% достоверно выше по сравнению с интактной группой ($p_{инт}$=0,037).

На 5 сутки обращает на себя внимание низкие показатели АЛТ во всех группах по сравнению с интактными значениями, наиболее достоверно это отмечено в группах БЦ+хлоргексидин (50,3 Ед/л, $p_{инт}$=0,012) и Левомеколь (52,7 Ед/л, $p_{инт}$=0,037). На 10 сутки этот показатель достоверно снизился на 7,5% только в группе БЦ + физраствор (45,6 Ед/л, $p_{инт}$=0,037). На 28 сутки показатели АЛТ в основных группах достоверно снизились, из них в 1 группе на 51,5% (47,1 Ед/л, $p_{инт}$=0,012, $p_{лев}$=0,020), во 2 группе на 27,3% (49,2 Ед/л, $p_{инт}$=0,020), тогда как в 3 группе отмечен рост АЛТ на 8,5% (67,2 Ед/л, $p_{инт}$=0,020). Также к окончанию лечения в основных группах отмечаются достоверно низкие показатели АСТ по сравнению с контролем на 43% в группе БЦ+физраствор (26,6 Ед/л, $p_{контр}$=0,012) и на 46,3% в группе БЦ+хлоргексидин (25,1 Ед/л, $p_{инт}$=0,020) с животными без термотравмы.

В результате проведенных исследований было установлено, что заживление экспериментальных ожоговых ран в закрытой среде с использованием различных раневых покрытий на основе целлюлозных гель-пленок сопровождается повышением уровня гематокрита, гемоглобина, количества эритроцитов, тромбоцитов, отсутствием лейкоцитоза, снижением количества общего белка, увеличением АСТ, АЛТ. К 28 суткам экспериментальных исследований отмечены достоверно худшие лабораторные показатели в 3 группе по сравнению с 1 и 2 группой: по количеству тромбоцитов (меньше на 32,2% и 53,8%, $p<0,001$); количеству лейкоцитов (больше на 27,9% и 33,8%, $p<0,001$), уровню гемоглобина (ниже 3,7% и 9,1%, $p<0,05$), уровню АЛТ (выше на 29,1% и 33,1%, $p<0,001$), уровню АСТ (выше на 29,9% и 26,8%, $p<0,001$). Это подтверждалось более лучшим заживлением ран в основных группах, где их скорость эпителизации раны на 18,2% ($p<0,05$) превосходило группу сравнения.

РЕЗЮМЕ

Таким образом, установлено, что плотность воспалительного инфильтрата в 1 группе снизилась с 5-го дня к концу эксперимента в 1,5 раза, в группе БЦ + хлоргексидин в 1,8 раз и в группе Левомеколь в 1,46 раз. Количество фибробластов и кровеносных сосудов в связи с развитием грануляционной ткани возрастало к концу эксперимента, максимальные значения отмечались также в группе при использовании БЦ и хлоргексидином (критерий 4). При этом количество фибробластов увеличилось в 2,5 раз, кровеносных сосудов 3,6 раз. Самые медленные регенеративные процессы отмечались в группе при использовании препарата «Левомеколь» (критерий 2 и 3). В течение первых 10 суток лечения глубоких ожоговых дефектов кожи в показателях крови у крыс породы Wistar кожи в группах, где лечение осуществлялось с помощью биоматериалов на основе бакцеллюлозы и в группе с традиционным подходом с использование мазевых повязок было отмечено повышение уровня гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов, что может свидетельствовать о гемоконцентрации в системном кровотоке вследствие термического повреждения. На 28 сутки экспериментов регистрируется некоторое снижение этих показателей в 1 и 2 группе, тогда как в 3 группе эта тенденция была выражена на 5-10% сильнее. Также в начале лечения в 1 и 2 группе отмечен высокий уровень тромбоцитов со снижением их к середине наблюдений и ростом к окончанию лечения, однако в группе с мазью Левомеколь наоборот было отмечено падение на 20% (324х109), что также ниже показателя интактной группы животных. Это могло указывать на процесс потребления при открытом ведении инфицированной ожоговой раны в процессе ежедневных перевязок. Течение всего периода наблюдений не характеризовалось наличием лейкоцитоза, при этом лейкоциты регистрировались в пределах референтных значений. На 10 сутки отмечено некоторое повышение уровня лейкоцитов во всех группах по сравнению с контролем. К окончанию эксперимента в основных группах животных наблюдается снижение этого показателя, тогда как в 3 группе

уровень лейкоцитов наоборот вырос на 26,5%. В процессе наблюдений критических изменений уровня общего белка также не отмечено. Установлено, что на 5 сутки в группах имелись более низкие показатели общего белка по сравнению с интактными животными, что свидетельствовало о первой реакции организма на ожоговую травму. К окончанию наблюдений во всех группах отмечено умеренное восстановление этого показателя, значения которого приближаются к показателям контрольной и интактной группы животных. Более значимый рост уровня общего белка отмечен во 2 группе, где он равнялся 71,4 г/л. Достоверно значимых изменений уровня креатинина в группах не наблюдалось, показатели находились в пределах нормальных значений, что свидетельствовало об отсутствии почечного повреждения в результате течения смоделированной ожоговой травмы. При исследовании содержания глюкозы отмечено, что в группах на 5 сутки ее уровень достоверно ниже по сравнению с контролем. К 10 суткам отмечен достоверный рост этого показателя, наиболее выраженный в 3 группе, где сахар крови достиг 12,4 ммоль/л. В целом, к окончанию исследований происходит медленное снижение содержания глюкозы во всех группах, не имея значимости различий. Оценка функции печени показала достоверное снижение на 28 сутки уровня АЛТ в 1 группе на 51,5%, во 2 группе на 27,3%, тогда как в 3 группе отмечен рост АЛТ на 8,5%, что достоверно выше интактных значений. Аналогичные изменения отмечены в динамике АСТ, что в целом может свидетельствовать о возможных нарушениях ферментобразующей функции печени при открытом ведении ожоговой раны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время различные подходы к лечению ран различного генеза включают медикаментозную терапию, композитные повязки в том числе гидрогелевые, хирургическое лечение ран с помощью вакуумного коллабирования ран с помощью отрицательного давления. Каждый из них имеет свои, как положительные, так и отрицательные стороны [17]. Проблема местного лечения ран заключается не только в подборе оптимальных перевязочных материалов, но и в правильном их использовании, что требует определенных условий и навыков.

В арсенале современного хирурга, помимо традиционных и простых материалов для обработки ран, такие как ватные тампоны, марля и бинты различных типов, используется широкий спектр более специализированных средств, например, из вискозы, хитозана или с антисептической пропиткой. Классические материалы чаще всего применяются для первичной обработки раны с остановкой кровотечения. Наиболее сложные композитные раневые повязки выполняют уже более специальные задачи. Они могут обеспечивать нужный влагообмен и среду для раны, препятствовать ее микробной контаминации, способствовать протеолитическому воздействию на детрит и впитывать раневого экссудата, оказывать противовоспалительное и бактерицидное действие [166]. Входящие в состав многих композиционных материалов хитозан, желатин, крахмал, протеины, гиалуроновая кислота, полученные из растений, животных и микроорганизмов и являющиеся натуральными биополимерами, уже на протяжении длительного времени зарекомендовали себя с положительной стороны в лечении ран и раневой инфекции.

Высокая гидрофильность, большая площадь соприкосновения, химическая чистота и кристалличность вследствие трехмерной микрофибриллярной структуры позволяют целлюлозным биопленкам все больше внедряться в хирургию раневых процессов и позиционировать их, как идеальных носителей терапевтических препаратов, таких как цитокины и стимуляторы факторов роста, антибиотики, антисептики и противораковые средства [57, 65, 68]. Микробная целлюлоза,

представленная внеклеточным природным полимером, полностью безопасна в биологических приложениях и, хотя по своему происхождению не является антимикробной, она может являться матрицей для направленной доставки антисептиков, антибактериальных препаратов с целью более эффективного воздействия на бактериальную флору [24, 27]. Внимание к применению целлюлозных мембран для терапии дермальных повреждений разнообразного происхождения возникло из-за её совместимости с клетками биологического происхождения и отсутствия токсичности, гибкости, способности сохранять влажность и поэтому анализ ее возможностей становится частью научных изысканий в области биологических технологий и восстановительной медицины биотехнологиям [62, 69, 73].

Вопрос о совместимости организма с биологическими покрытиями при их применении для лечения ожоговых повреждений остается неясным до сих пор. Не уточнено как влияют эти целлюлозные пленки на показатели гомеостаза, имеются ли изменения в показателях периферической крови, основных биохимических константах, что происходит с регенераторными процессами и как заживают раны при использовании этих материалов [67]. Хотя различные эксперименты показали, что препараты на основе биоцеллюлозы не проявляют токсического влияния на геном, не стимулируют канцерогенез и не влияют на репродуктивные функции исследования по изучению ее биосовместимости, биодеградации и безопасности все еще представлены в недостаточном количестве [23, 45, 53, 103, 113].

В работе была поставлена цель экспериментального обоснования разработки новой биомедицинской технологии, включающей применение биологических раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы в хирургии ожоговых ран. В соответствии с поставленной целью и задачами были определён дизайн и два этапа исследования.

Первый этап работы был посвящен исследованиям безопасности целлюлозных биопленок, которые в последующем предполагалось применять для лечения раневых поверхностей после глубоких ожогов кожи. На данном этапе

изучалась острая токсичность при накожном применении БЦ на крысах лини Wistar и ее цитотоксичность при взаимодействии с дермальными фибробластами человека. За 24 часа до исследования основной группе из 10 животных выстригалась шерсть в области спины до 5 см в диметре. Влажные целлюлозные пленки, размером 2,5 х 25см, наносили с равномерным давящим распределением по всей поверхности обработанного участка кожи однократно. Сверху для устойчивости материал фиксировался тугой повязкой. Таким образом при нанесении кусочка БЦ оценивали возможное его местное раздражающее действие на кожу. В контроле из 10 крыс на обработанную кожу наносили обычную марлевую повязку такого же размера, обработанную 0,9% изотоническим раствором хлорида натрия. Регистрацию и оценку возможных кожных реакций, как проявление острого токсического воздействия исследуемых целлюлозных пленок, осуществляли сразу после нанесения материала и в дальнейшем через 1, 2, 24, 48, 72 часа. Появление отечности, покраснения кожи, образование кровоизлияний, трещин, изъязвлений, сухих корочек считали критериями токсического воздействия.

Потребление корма и воды в сутки оценивалось до и после нанесения гель-пленки на раневую поверхность животного. Дополнительно, для оценки возможного общего токсического воздействия БЦ у животных перед нанесением пленки фиксировалась масса тела, а затем в она же измерялась течение последующих 72 часов. Каждое животное наблюдали отдельно непрерывно в течение первых 24 часов. После нанесения целлюлозной пленки на кожу особое внимание уделялось первым 8-ми часам эксперимента. С учетом возможного развития картины интоксикации на протяжении 14 дней наблюдение за животными осуществлялось в утреннее и вечернее время. Крыс осматривали, как на открытой поверхности, на руках, так и в клетках. Значительные изменения поведенческих реакций, в том числе нарушения потребления пищи и воды, дефекации, частоты дыхания, температуры тела, локомоция и груминг считали токсическим проявлением на общее состояние. Сравнительное гистологическое исследование

производили через 2 недели после забора органокоплекса с предварительной эвтаназией крыс каждой группы под наркозом. Наряду с местными изменениями окружающих тканей, в критерии оценки острой накожной токсичности при использовании целлюлозных гель-пленок вошли изменения их поведения, общая клиническая картина интоксикации, а также учет возможного числа умерших крыс со сроками их смерти. Оценка цитотоксичности in vitro проводили методом экстракции с заливкой каждый образец с площадью 2 $см^2$ полной ростовой средой до 5 мл и выдерживали на протяжении 24 часов при 37 0С инкубаторе. В исследовании использовался 5-й пассаж линии клеток дермальных фибробластов, выделенных из кожи человека ранее по усовершенствованной методике с оценкой общей морфологии, целостности клеточных мембран, вакуолизации, расщепления, лизиса клеток.

На первом этапе исследований установлено, что при накожном применении биопокрытия из БЦ не проявляют явлений острого токсического воздействия на организм животного. Это подтверждалось отсутствием изменений температуры, отсутствием увеличения частоты дыхательных движений, масса тела животных на протяжении эксперимента только увеличивалась. Летальных исходов не отмечалось. Данный вывод согласуется с исследованиями Петрухина И.Ю. соавт. (2016), Pinto F.C. et al. (2016), Dourado F. et al. (2017) [23, 45, 103]. Дополнительно в эксперименте было установлено отсутствие цитотоксичности при контакте БЦ с дермальными фибробластами человека.

Второй этап заключался в оценке эффективности заживления экспериментальных ожоговых ран при использовании двух групп повязок на основе целлюлозных пластин (БК в физиологическом растворе и БК с адсорбцией 1% раствора хлоргексидина) по сравнению с обычными местными средствами лечения (группа сравнения) и контрольной группой животных. В ходе исследований проведена оценка клинических, бактериологических, патоморфологических, морфометрических, лабораторных изменений. Образцы гелевой пленки микробной целлюлозы, полученные в лаборатории биоконверсии

ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск были использованы в качестве материала для экспериментальных раневых покрытий. Влажная пленка БК представляет собой биополимер глюкозы, влажная полимерная волокнистая наноструктура которого синтезирована путем химического гидролиза моносахаридов. В экспериментальных исследованиях всего было использовано 100 крыс типа Wistar.

Изучение применения целлюлозных пленок в качестве биологического раневого покрытия при лечении ожоговых ран проводилось на модели гранулирующих ран после формирования глубоких ожогов II-III степени и соответствовало условиям эксперимента [17, 18]. Для создания тяжелой термической травмы у животных (60 беспородных крыс-самцов, массой 200–240 г.) выстригалась шерсть в зоне нанесения ожога. Под однокомпонентным внутрибрюшным наркозом (раствор Телазола в концентрации 1 мг/кг) в межлопаточном пространстве спины крысы линии Wistar, весом 230-300 после предварительно нагревания металлической пластины формировался глубокий ожог путем плотного соприкосновения кожи животного с нагретой поверхностью металлической пластины. Биопокрытия с БЦ после некрэктомии укладывались на раневую поверхность на 3-5 суток, после чего по мере высыхания и изменения цвета на серо-желтый во время повязки заменялись на новые. Оценка эффективности заживления ожоговых ран производилась на 5, 10, 20, 28 сутки после нанесения материала на ожоговую рану, при этом учитывалась скорость и сроки полного заживления на основе визуальной макроскопической картины с учетом патоморфологических и морфометрических критериев, микробного пейзажа ран. Дополнительно учитывались лабораторные показатели крови, включающий значения развернутого и биохимического анализа.

Для проведения эксперимента из 80 самок и самцов беспородных крыс линии Wistar с массой от 200 до 240 грамм были сформированы 4 группы, в каждую из которых вошло по 20 особей. Первая основная группа включала 20 крыс, лечение ожоговых ран которых осуществлялось на основе влажных целлюлозных покрытий, содержащихся в 0,9% изотоническом растворе хлорида натрия. Вторая

основная группа из 20 крыс включала лечение ран влажными целлюлозными биопленками, находящихся в 1% растворе хлоргексидина и учитывала адсорбцию антисептика на материал. В третью группу, группу сравнения вошли 20 крыс, лечение ожоговых ран которых проводилось традиционным открытым методом с использованием ежедневных марлевых повязок с мазью Левомеколь. И, наконец, 20 крыс составили контрольную 4 группу.

Спустя 3-5 суток в ранах крыс 1 и 2 группы образовывался струп серо-коричневого цвета вследствие высыхания целлюлозного материала. Этим достигалось плотная фиксация материала на ожоговой поверхности и к краям кожи. Поэтому бинт, который накладывали сверху для дополнительной фиксации повязки, к ране не прилипал. Если отсутствовали признаки инфицирования (подтекание гнойного экссудата, мокнутие, фрагментация) струп во время перевязок не убирали, и он мог находиться на поверхности раны до 10 суток, формируя механический барьер, препятствующий дополнительным травмирующим воздействиям на рану. Уже через 10 дней наблюдений ожоговые раны у всех животных трех групп начинали эпителизироваться. На скорость эпителизации ожоговых ран оказались больший эффект бактериальные целлюлозные мембраны, что было подтверждено объективным исследованием с измерением площади ран в динамике. Уже на 5 сутки высохшие биопленки были уже хорошо фиксированы к ранам 1 и 2 группе, хотя эпителизации раны под ними еще не отмечалось и лишь только имелся серозный экссудат в небольшом количестве. Однако, после удаления пластины на 10 сутки заживление раны произошло больше чем на половину. На 20 сутки заживление раны отмечается более чем на две трети площади раневой поверхности. В 1 и 2 группе высохшие пластины снимались легко, кровотечения не было и подлежащие образующиеся молодые клетки при этом не повреждались. Не определялось признаков инфекции с образованием абсцессов или скоплением гнойного экссудата в обеих группах животных, где лечение термических кожных ран осуществлялось с помощью различных целлюлозных пленок.

В группе сравнения, где использовались ежедневные перевязки с помощью водорастворимой мази, с 5 суток текстиль был плотно прикреплен непосредственно к раневой поверхности. Наличие серозно-геморрагического экссудата, мокнущий раневой детрит и признаки воспаления были характерными признаками течения ран этой группы. Удаление марли при ежедневных перевязках сопровождалось травматизацией раневой поверхности, что приводило раневой диапидезной кровоточивости и сопровождалось неадекватным поведением животных. При визуальной оценке также в этой группе уменьшение размеров раневого дефекта и его эпителизация на 5 и 10 сутки шли медленнее, по сравнению с группами, где применялись биопленки на основе целлюлозы. Экспериментальные исследования показали, что на 15 сутки во всех трех группах животных отмечается уменьшение площади ожоговой поверхности ($p>0,05$). Наибольшая скорость заживления отмечена при использовании целлюлозных гель-пленок в 1 группе (на 47,3±1,8%) и во 2 группе (на 44,5±2,1%). По сравнению в 3 группе заживление шло медленнее, лишь на 38,0±1,2% ($p<0,05$). На протяжении последующих суток во всех группах сохранялась эпителизация раневых дефектов, однако у животных в 1 и 2 группе, где использовались биопокрытия она была более интенсивнее.

В результате проведенных исследований были представлены доказательства более лучшего заживления ожоговых ран в основных группах с использованием биоцеллюлозных покрытий, что нашло отражение в полном закрытии раневого дефекта практически у всех животных к окончанию лечения. Патоморфологические отличия заживления экспериментальных глубоких постожоговых ран при лечении их с помощью раневых покрытий на целлюлозных биопокрытий в сравнении с традиционным открытым ведением к 28 суткам наблюдений заключались в более эффективном уменьшении плотности воспалительного инфильтрата; меньшей выраженностью нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрации; более плотном расположении фибробластов, коллагеновых волокон; образовании большего количества новых сосудов капиллярного типа.

Таким образом, лечение глубоких ожогов кожи 3 степени у крыс с помощью биоцеллюлозных покрытий сопровождается образованием плотного струпа, отторжение которого происходит в среднем на 10-12 сутки с образованием под ним хорошо эпителизирующегося раневого ложа. Для закрытия раны достаточно 2-х, 3-х кратного применения указанных биопленок. Положительные свойства биопленок на основе целлюлозных материалов, подтвержденные в результате экспериментальных исследований, заключаются в создании закрытой технологии ведения, исключающей контакт между раной и окружающей внешней средой, защищающей ее от травматизации вследствие механического повреждения. Но, а снижение экссудации ран и уменьшение их инфицирования является наиболее главным моментом при создании данного направления в лечении. Это согласуется с исследованиями Винника Ю.С. с соавт. (2016), Зиновьева Е.В. с соавт. (2019), Черниговой С.В. с соавт. (2021), Lupascu R.E. et al. (2021) [22, 26, 34, 52].

По данным показателей реакции системы периферической крови и на основе объективных признаков заживления ран констатировано, что в 1 и 2 группе, где использовалась целлюлозные покрытия имеются признаки небольшое гемоконцентрации, вследствие увеличения уровней, гематокрита, гемоглобина, количества эритроцитов. К окончанию лечения регистрируется умеренное снижение этих показателей в 1 и 2 группе, тогда как в 3 группе эта тенденция была выражена на 5-10% сильнее. В начале лечения в 1 и 2 группе отмечен высокий уровень тромбоцитов со снижением их к середине наблюдений и ростом к окончанию лечения, однако в группе с мазью Левомеколь наоборот было отмечено падение на 20% ($324x10^9$), что также ниже показателя интактной группы животных. Это могло означать процесс потребления при открытом ведении инфицированной ожоговой раны в процессе ежедневных перевязок. Течение всего периода наблюдений не характеризовалось наличием лейкоцитоза, при этом лейкоциты регистрировались в пределах референтных значений. Небольшое повышение уровня лейкоцитов во всех группах по сравнению с контрольной группой выявлено на 10 сутки экспериментов. По окончанию лечения в 1 и 2 группе крыс происходит

уменьшение этих значений, однако в 3 группе уровень лейкоцитов наоборот вырос на 26,5%. В процессе наблюдений критических изменений уровня общего белка также не отмечено. Установлено, что на 5 сутки в группах имелись более низкие показатели общего белка по сравнению с интактными животными, что свидетельствовало о первой реакции организма на ожоговую травму. К окончанию наблюдений во всех группах отмечено умеренное восстановление этого показателя, значения которого приближаются к показателям контрольной и интактной группы животных. Более значимый рост уровня общего белка отмечен в группе БЦ+хлоргексидин, где он равнялся 71,4 г/л. Достоверно значимых изменений уровня креатинина в группах не наблюдалось, показатели находились в пределах нормальных значений, что свидетельствовало об отсутствии почечного повреждения в результате течения смоделированной ожоговой травмы. При исследовании содержания глюкозы отмечено, что в группах на 5 сутки ее уровень достоверно ниже по сравнению с контролем. К 10 суткам отмечен достоверный рост этого показателя, наиболее выраженный в 3 группе, где сахар крови достиг 12,4 ммоль/л. Во всех группах животных некоторое снижение концентрации глюкозы отмечалось также к 28 суткам. На 28 сутки при оценке основных показателей функционального состояния печени установлено, что происходит снижение уровня АЛТ в 1 группе на 51,5%, во 2 группе на 27,3%, тогда как в 3 группе отмечен рост аланиновой трансаминазы на 8,5%, что достоверно выше интактных значений и свидетельствует о возможных нарушениях ферментобразующей функции печени при открытом ведении ожоговой раны. Положительные изменения лабораторных показателей при использовании в лечении ожоговых ран БЦ соответствуют исследованиям Кабак В.А. с соавт. (2022), Тюхтевой Н.М. с соавт. (2021), Шарко А.А. с соавт. (2022), Aditya T. et al. (2022) и др. [10, 28, 35, 169, 170].

В целом проведенные экспериментальные исследования с разработкой новой бионанотехнологии заживления ран, возникающих при глубоких ожогах кожи с использованием новых биологических раневых покрытий на основе бактериальной

целлюлозы, показали высокую эффективность. Были получены обнадеживающие результаты успешного лечения ран в закрытой среде. В этой связи открываются новые терапевтические горизонты в области лечения ожоговых ран и других различных раневых процессов, возникающих в клинической практике, и поэтому применение БЦ в этом направлении может явиться одним из перспективных биологических продуктов.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная биотехнология лечения ран кожи животных вследствие глубоких ожогов с помощью влажных раневых биопокрытий на основе БЦ, накладываемых в ранние сроки, направлена на формирование над раневой поверхностью защитного механического барьера, препятствующего повреждению образующихся в ране новых клеточных элементов, способствующего снижению ее экссудации за счет сорбционных свойств материала, микробной контаминации, улучшающего процессы микроциркуляции, что в итоге при уменьшении количества перевязок ускоряет заживление ран в 1,3 раза ($p<0,05$) по сравнению с открытым ведением.

2. На основе экспериментальных клинических наблюдений установлена безопасность раневых биопокрытий на основе БЦ при накожном применении, что подтверждается отсутствием повышения температуры тела и увеличения частоты дыхания животных в период 72 часов ($p>0,05$), достоверным увеличением их массы в течение 14 суток на 4,4% ($p<0,05$), отсутствием аллергических и токсических реакций. Образцы БЦ не обладают цитотоксичностью, что определяется отсутствием изменений in vitro в дермальных фибробластах человека при сравнении с контрольной группой (расположение, форма клеток и ядра, количество и размер ядрышек, вакуолей в цитоплазме).

3. Патоморфологические особенности заживления экспериментальных ожоговых ран при лечении с помощью раневых биопокрытий на основе БЦ по сравнению с традиционным открытым ведением к 28 суткам наблюдений отличаются более эффективным уменьшением плотности воспалительного инфильтрата; меньшей выраженностью нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрации; более плотным расположением фибробластов, коллагеновых волокон; образованием большего количества новых сосудов капиллярного типа. По результатам гистологических срезов к 28 суткам у более 90% животных основных групп раневые поверхности достигли окончательных патоморфологических

критериев заживления, тогда как в группе сравнения это удалось только у 60% особей, что превосходит в среднем на 18,2% ($p<0,05$).

4. Процесс заживления экспериментальных ожоговых ран в закрытой среде с использованием различных раневых биопокрытий на основе БЦ сопровождается повышением уровня гемоглобина, гематокрита, количества эритроцитов и тромбоцитов, отсутствием лейкоцитоза, снижением количества общего белка, увеличением АЛТ, АСТ. На 28 сутки эксперимента отмечены достоверно худшие лабораторные показатели в группе с традиционным лечением по сравнению с 1 и 2 группой: по количеству тромбоцитов (меньше на 32,2% и 53,8%, $p<0,001$); количеству лейкоцитов (больше на 27,9% и 33,8%, $p<0,001$), уровню гемоглобина (ниже 3,7% и 9,1%, $p<0,05$), уровню АЛТ (выше на 29,1% и 33,1%, $p<0,001$), уровню АСТ (выше на 29,9% и 26,8%, $p<0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Влажные биопластины бактериальной целлюлозы при накожном применении у экспериментальных животных и при контакте с дермальными фибробластами человека in vitro не приводят к развитию острой токсичности, цитоксичности, что позволяет их относить к 4 классу безопасности материалов.

2. Использование раневых биопокрытий на основе бактериальной целлюлозы позволяет лечить в ожоговую рану в закрытой среде, уменьшить риск бактериальной контаминации, одновременно снизить количество перевязок и повысить скорость заживления.

3. Полученные положительные экспериментальные результаты лечения глубоких ожогов кожи с помощью раневых биопокрытий на основе бактериальной целлюлозы позволяют обосновать их клиническое применение в комбустиологии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее исследование свойств бактериальной целлюлозы заключается в проведении клинических исследований по оценке ее эффективности в лечении пациентов с ожогами в хирургических отделениях и амбулаторном этапе, а также с длительно незаживающими ранами на фоне сосудистых нарушений, сахарного диабета.

Достаточно перспективным выглядит изучение адсорбционных свойств бактериальной целлюлозы при взаимодействии с лекарственными препаратами (антибиотики, антисептики, противовоспалительные средства) и процесс их высвобождения на раневых поверхностях у больных с ранами кожи и мягких тканей различного генеза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

БЦ – бактериальная целлюлоза

ИЛ – интерлейкины

КОЕ – колониеобразующие единицы

ММП – матриксные металлопротеиназы

СВФ – стромально – васкулярная фракция

СМК – стромальные мезенхимальные клетки

ФЗ – физиологический раствор

ФНО-α – фактор некроза опухоли

ХГ – хлоргексидин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.А. Лечение поверхностных и пограничных ожоговых ран с применением современных раневых повязок / А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников, С.Н. Хунафин // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – № 8(3). – С. 25-30.

2. Алексеев, А.А. Местное консервативное лечение ожогов: Учебно-методическое пособие / А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2015. – 144 с.

3. Алексеев, А.А. Современные методы лечения ожогов и ожоговой болезни / А.А. Алексеев // Комбустиология. – 1999. – № 1. – С.1-9.

4. Алексеев, А.А. Экстренная и неотложная медицинская помощь после ожоговой травмы /А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников, Н.Б. Малютина // Медицинский алфавит. – 2016. – Т. 2, № 15. – С. 6-12.

5. Анализ и особенности работы ожоговых стационаров в России в 2022 году / А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников, Н.Б. Малютина, К.А. Филимонов // Комбустиология. – 2023. – № 69-70.

6. Бактериальная целлюлоза, синтезируемая GLUCONACETOBACTER HANSENII, для использования в медицине / Т.И. Громовых, Т.С. Садыкова, С.В. Луценко [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 1. – С. 69-75.

7. Бобровников, А.Э. Новые возможности и эффективность антимикробного лечения ожоговых ран / А.Э. Бобровников, А.А. Алексеев, М.Г. Лагвилава // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Современные аспекты лечения термической травмы». - СПб, 2011. – С. 23-25.

8. Бобровников, А.Э. Персонализированные технологии местного консервативного лечения ожоговых ран / А.Э. Бобровников, А.А. Алексеев // Лечение и профилактика. – 2017. – Т.23, № 3. – С. 75-83.

9. Борисов, Д.Н. Контроль за состоянием здоровья военнослужащих в ходе проведения лечебно-эвакуационного обеспечения войск (сил) с использованием

современных средств информатизации / Д.Н. Борисов, Р.Н. Лемешкин, В.О. Хилько // Военная мысль. – 2017. – № 4. – С. 47-55.

10. Гемостатическое покрытие на основе модифицированной бактериальной целлюлозы: структура и свойства / В.А. Кабак, Д.Ю. Бычичко, А.Р. Лемперт [и др.] // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2022. – Т. 64, № 1. – С. 94-104.

11. Гладышева, Е.К. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой Medusomyces gisevii / Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба // Вестник ВГУИТ. – 2015. – №3 (65).

12. Евдокимов, В.И. Генезис научных статей по ожоговой травме (анализ отечественных журнальных статей в 2005–2017 гг.) / В.И. Евдокимов, А.С. Коуров // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2018. – № 4. – С. 108-120.

13. Изучение депонирования гентамицина в составе целлюлозы с альбумином / Т.Е. Миронова, В.Н. Афонюшкин, Н.А. Сигарева [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2019. – Т. 49, № 5. – С. 61-66.

14. К вопросу о тангенциальной некрэктомии в хирургии ожогов (обзор литературы) / Е.В. Зиновьев, В.В. Солошенко, А.С. Коуров, С.Г. Шаповалов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2020. – № 3. – С. 24-35.

15. Карякин, Н.Н. Технологии лечения ожогов в условиях влажной среды / Н.Н. Карякин, И.А. Клеменова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 9. – С. 495-499.

16. Кобелев, К.С. Современное состояние проблемы местного консервативного лечения поверхностных и пограничных ожогов / К.С. Кобелев, В.И. Мидленко // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2017. – № 4. – С. 8-19.

17. Ковальчук, А.О. Морфометрические показатели кожи животных с экспериментальной ожоговой травмой при проведении раннего хирургического лечения с использованием гидрогелевых повязок и полиуретановых адсорбентов / А.О Ковальчук // Новости хирургии. – 2016. – Т. 24, № 2. – С. 109-119.

18. Моделирование ожоговой травмы в эксперименте на лабораторных животных / А.Л. Адмакин, В.А. Максюта, В.С. Кутырин [и др.] // Комбустиология. – 2013. – № 49-50.

19. Морфологическая оценка влияния коллагеновой повязки на заживление ожоговых ран IIIа степени / Е.Г. Колокольчикова, М.В. Сычевский, Е.А. Жиркова [и др.] // Трансплантология. – 2010. – № 3-4. – С. 64-67.

20. Определение показателей лечебно-эвакуационной характеристики и оценка их влияния на организацию оказания медицинской помощи раненым (больным) хирургического профиля в военной полевой медицинской организации / А.М. Шелепов, И.М. Самохвалов, В.Г. Миронов [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии – 2015. – № 1. – С. 173-177.

21. Организация оказания медицинской помощи пострадавшим от ожогов в мирное и военное время / А.А. Алексеев, А. Э. Бобровников, М.Б. Малютина [и др.] // Материалы XV съезда хирургов России совместно с IX конгрессом московских хирургов. – М., 2023. – С. 115.

22. Оценка эффективности раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы с фукоиданом при ожогах кожи / Е.В. Зиновьев, С.А. Лукьянов [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2019. – Т. 65, № 1. – С. 148-152.

23. Петрухин, И.Ю. Оценка цитотоксичности бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом Gluconacetobacter hansenii / И.Ю. Петрухин, А.Г. Демченко, В.В. Каширин // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 227-228.

24. Погорелова, Н.А. Морфологические особенности строения бактериальной целлюлозы и нанокомпозитов на ее основе для изготовления современных раневых покрытий / Н.А. Погорелова, С.В. Чернигова, Е.А. Рогачев // Вестник Омского ГАУ. – 2019. – Т. 4, № 36. – С. 131-141.

25. Подойницына, М.Г. Применение физических методов при лечении ожогов кожи / М.Г. Подойницына, В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.

26. Применение раневого покрытия на основе целлюлозы у больных с гнойными заболеваниями мягких тканей / Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, Е.И. Шишацкая [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. – 2016. – № 9. – С. 121-128.

27. Регенеративная терапия тканевыми протекторными цитокинами в составе раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы / Н.Г. Венгерович, А.К. Хрипунов, Э.А. Рузанова [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2016. – № 1. – С. 37-46.

28. Результаты применения раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы, нагруженной наночастицами серебра, у больных с длительно незаживающими трофическими язвами на фоне хронической венозной недостаточности / Н.М. Тюхтева, Ю.С. Винник, Н.С. Соловьева [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2021. – Т.14, № 4. – С. 526-532.

29. Свойства композитов бактериальной целлюлозы и наночастиц серебра / Н.П. Шидловский, А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая, Т.Г. Волова // Биофизика. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 669-676.

30. Современные взгляды на проблему местного лечения ожоговых ран / Д.А. Рузимуратов, А.Д. Фаязов, У.Р. Камилов [и др.] // Вестник экстренной медицины. - 2022. – Т. 5(15). – С. 90-98.

31. Состояние и перспективы совершенствования способов получения и использования бактериальной целлюлозы (обзор) / Е.А. Рогова, Ю.Д. Алашкевич, В.А. Кожухов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2022. – № 4. – С. 27-46.

32. Харченко, А.В. Бактериальная наноцеллюлоза как пластический материал для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки: обзор литературы / А.В. Харченко, В.В. Ступак // Хирургия позвоночника. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 62-73.

33. Хирургическое лечение пострадавших от ожогов: клинические рекомендации / А.А. Алексеев, М.Г. Крутиков, И.В. Шлык [и др.] // Общероссийская общественная организация «Объединение комбустиологов «Мир без ожогов». – Москва, 2015. – 12 с.

34. Чернигова, С.В. Нанопокрытие в местном лечении ожоговых ран / С.В. Чернигова, Н.В. Зубкова, Е.С. Дочилова // Вестник Омского ГАУ. – 2021. – Т. 44, № 4. – С. 173-179.

35. Шарко, А.А. Антибактериальные свойства композитов на основе гель-плёнок бактериальной целлюлозы с добавлением хлоргексидина / А.А. Шарко, Н.А. Клёнова // Universum: химия и биология. – 2020. – № 7 (73). – С. 20-22.

36. 3D bioprinting of functional human skin: Production and in vivo analysis / N. Cubo, M. Garcia, J. Del Canizo [et al.] // Biofabrication. – 2016. – Vol. 9. – P. 015006.

37. 3D printing of PVA/hexagonal boron nitride/bacterial cellulose composite scaffolds for bone tissue engineering / D. Aki, S. Ulag, S. Unal [et al.] // Mater Des. – 2020. – Vol. 196. – P. 109094.

38. A covalently cross-linked hyaluronic acid/bacterial cellulose composite hydrogel for potential biological applications / S. Tang, K. Chi, H. Xu, Q. Yong [et al.] // Carbohydr Polym. – 2021. – Vol. 252. – P. 117-123.

39. A new glioblastoma cell trap for implantation after surgical resection / L. Autier, A. Clavreul, M.L. Cacicedo [et al.] // Acta Biomater. – 2019. – Vol. 84. – P. 268-279.

40. A Novel Small-Caliber Bacterial Cellulose Vascular Prosthesis: Production, Characterization, and Preliminary In Vivo Testing / A.F. Leitão, M.A. Faria, A.M.R. Faustino [et al.] // Macromol. Biosci. – 2016. – Vol. 16 – P. 139-50.

41. A Review of Functionalised Bacterial Cellulose for Targeted Biomedical fields / Y. Emre Oz, Z. Keskin-Erdogan, N. Safa, E. Esin Hames Tuna // J. Biomater. Appl. – 2021. – Vol. 36, № 4. – P. 648-681.

42. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression / J.W. Shupp, T.J. Nasabzadeh, D.S. Rosenthal [et al.] // J Burn Care Res. – 2010. – Vol. 31, № 6. – P. 849-873.

43. A Technology for Pilot Production of Bacterial Cellulose from Oat Hulls / E.A. Skiba, V.V. Budaeva, E.V. Ovchinnikova [et al.] // Chemical Engineering Journal. – 2020. – Vol. 383. – P. 123-128.

44. A wet dressing for male genital surgery: A phase II clinical trial / F.D.O. Vilar, F.C.M. Pinto, A.V. Albuquerque [et al.] // Int. Braz. J Urol. – 2016. – Vol. 42. – P. 1220-1227.

45. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses / F.C. Pinto, A.C. De-Oliveira, R.R. De-Carvalho [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2016. – Vol. 137. – P. 556-560.

46. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions / F. Barrère, T.A. Mahmood, K. de Groot, C.A. van Blitterswijk // Materials Science and Engineering: R: Reports. – 2008. – Vol. 59. – P. 38-71.

47. Advanced materials from fungal mycelium: Fabrication and tuning of physical properties / M. Haneef, L. Ceseracciu, C. Canale [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 41292156.

48. Advanced smart biometerials and constructs for hard tissue engineering and regeneration / K. Zhang, S. Wang, C. Zhou [et al.] // Bone Res. – 2018. – Vol. 6. – P. 31.

49. Advances in skin regeneration using tissue engineering / K. Vig, A. Chaudhari, S. Tripathi [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18. – P. 789.

50. Aligned electrospun cellulose scaffolds coated with rhBMP-2 for both in vitro and in vivo bone tissue engineering / X. Zhang, C. Wang, M. Liao [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2019. – Vol. 213. – P. 27-38.

51. Alleviating neuropathy of diabetic foot ulcer by co-delivery of venlafaxine and matrix metalloproteinase drug-loaded cellulose nanofiber sheets: production, in vitro characterization and clinical trial / R. Meamar, S. Chegini, J. Varshosaz [et al.] // Pharmacol. Rep. – 2021. – Vol. 73. – P. 806-819.

52. An overview regarding microbial aspects of production and applications of bacterial cellulose / R.E. Lupascu, M.V. Ghica, C.E. Dinu-Pirvu [et al.] // Appl Microbiol Mater. – 2021. – Vol. 15, №2. – P.676.

53. Antibacterial Films Made of Bacterial Cellulose / Z. Sun, X. Li, Z. Tang [et al.] // Polymers (Basel). – 2022. – Vol. 14, № 16. – P. 3306.

54. Anti-inflammatory effect of stromal vascular fraction cells in fat transplantation / M. Zhu, J. Xue, S. Lu [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2019. – Vol. 17. – P. 1435-1439.

55. Antimicrobial hydrogels: Key considerations and engineering strategies for biomedical applications / K.J. Navare, L. Eggeermont, Z.J. Rogers [et al.] // Racing Surf. – 2020. – P. 511-542.

56. Application of Bacterial Cellulose in Skin and Bone Tissue Engineering / M. Pang, Y. Huang, F. Meng [et al.] // Eur. Polym. J. – 2020. – Vol. 122. – P. 109365.

57. Ashrafi, Z. Bioengineering tunable porosity in bacterial nanocellulose matrices / Z. Ashrafi, L. Lucia, W. Krause // Soft Matter. - 2019. – Vol. 15. – P. 9359-9367.

58. Assessment of the Usefulness of Bacterial Cellulose Produced by Gluconacetobacter Xylinus E25 as a New Biological Implant / M. Kołaczkowska, P. Siondalski, M.M. Kowalik [et al.] // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. – 2019. – Vol. 97. – P. 302-312.

59. Atalay, S. Stromal vascular fraction improves deep thickness burn wound healing / S. Atalay, A. Coruh, K. Deniz // Burns. – 2014. – Vol. 40. – P. 1375-1383.

60. Augemtation of diabetic wound healing and enhancement of collagen content using nanofibrous Glucophage-loaded collagen/PLGA scaffold membranes / C.H. Lee, S.H. Chang, W.J. Chen [et al.] // J. Colloid Interface Sci. – 2015. – Vol. 439. – P. 88-98.

61. Auger, C. Biochemical alterations underlying post-burn hypermetabolism / C. Auger, O. Samadi, M.G Jeschke // Biochem. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. – 2017. – Vol. 1863. – P. 2633-2644.

62. Bacterial cellulose and its applications / S.M. Choi, K.M. Rao, S.M. Zo [et al.] // Polymer. – 2022. – Vol. 14, №6. – P. 1080.

63. Bacterial cellulose and its potential for biomedical application / F. Wahid, L.H. Huang, X.Q. Zhao [et al.] // Biotechnol Adv. – 2021. – Vol. 53. – P. 107856.

64. Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application / J.D.P. de Amorim, C.J.G. da Silva Junior, A.D.M. de Medeiros [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 17. – P. 5580.

65. Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment / M.L. Cacicedo, G.A. Islan, I.E. León [et al.] // Colloids and Surffaces. B: Biointerfaces. – 2018. – Vol. 170, № 1. – P. 596-608.

66. Bacterial cellulose matrix with in situ impregnation of silver nanoparticles via catecholic redox chemistry for third degree burn wound healing / S. Jiji, S. Udhayakumar, K. Maharajan [et al.] // Carbohydr Polym. – 2020. – Vol. 245. – P. 116573.

67. Bacterial cellulose membrane produced by Acetobacter sp. A10 for burn wound dressing applications / M.H. Kwak, J.E. Kim, J. Go [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 122. – P. 387-398.

68. Bacterial Cellulose Membranes as Transdermal Delivery Systems for Diclofenac: *In Vitro* Dissolution and Permeation Studies / N.H.C.S. Silva, A.F. Rodrigues, I.F. Almeida [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2014. – Vol. 106. – P. 264-269.

69. Bacterial Cellulose Properties Fulfilling Requirements for a Biomaterial of Choice in Reconstructive Surgery and Wound Healing / J. Jankau, A. Błażyńska-Spychalska, K. Kubiak [et al.] // Front Bioeng Biotechnol. – 2022. – Vol. 9. – P. 805053.

70. Bacterial cellulose tubes as a nerve conduit for repairing complete facial nerve transection in a rat model / A. Binnetoglu, B. Demir, D. Akakin [et al.] // European archives of oto-rhino-laryngology. – 2020. – Vol. 277, № 1. – P. 277-283.

71. Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies / R.A. Pértile, S. Moreira, R.M. Gil da Costa [et al.] // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2012. – Vol. 23. – P. 1339-1354.

72. Bacterial cellulose-based biomaterials: From fabrication to application / C. Chen, W. Ding, H. Zhang [et al.] // Carbohydr Polym. – 2022. – Vol. 278. – P. 118995.

73. Bacterial Cellulose-Based Composite Scaffolds for Biomedical Applications: A Review / W. Liu, H. Du, M. Zhang [et al.] // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2020. – Vol. 8, № 20. – P. 7536-7562.

74. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging / J. Padrão, S. Gonçalves, J.P. Silva [et al.] // Food Hydrocoll. – 2016. – Vol. 58. – P. 126-140.

75. Bacterial infections after burn injuries: Impact of multidrug resistance / A.M. Lachiewicz, C.G. Hauck, D.J. Weber [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 65. – P. 2130-2136.

76. Bacterial nanocellulose as a corneal bandage material: A comparison with amniotic membrane / I. Anton-Sales, J.C. D'Antin, J. Fernández-Engroba [et al.] // Biomater. Sci. – 2020. – Vol. 8. – P. 2921-2930.

77. Bacterial nanocellulose-hyaluronic acid microneedle patches for skin applications: In vitro and in vivo evaluation / D.F.S. Fonseca, C. Vilela, R.J.B. Pinto [et al.] // Mater. Sci. Eng. – 2021. – Vol. 118. – P. 111350.

78. Bactericidal and antioxidant bacterial cellulose hydrogels doped with chitosan as potential urinary tract infection biomedical agent / D.Z. Zmejkoski, Z.M. Marković, N.M. Zdravković [et al.] // RSCAdv. – 2012. – Vol. 11. – P. 8559-8568.

79. Bayazidi, P. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties / P. Bayazidi, H. Almasi, A.K. Asl // Int. J. Biol. Macromolecules. – 2018. – Vol. 107. – P. 2544-2551.

80. Biocompatible Bacterial Cellulose Membrane in Dural Defect Repair of Rat / F.d.M.T.d. Lima, F.C. M. Pinto, B.L.d.S. Andrade-da-Costa [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2017. – Vol. 28, № 3. – P. 37.

81. Biomedical Applications of Microbial Cellulose in Burn Wound Recovery / W. Czaja, A. Krystynowicz, M. Kawecki [et al.]. – 2020. – Chapter 17.

82. BIO-NAIL: a Bacterial Cellulose Dressing as a New Alternative to Preserve the Nail Bed after Avulsion / M.H. Oliveira, F.C.M. Pinto, R.S. Ferraz-Carvalho [et al.] // Mater. Sci. Mater. Med. – 2020. – Vol. 31, № 12. – P. 121.

83. Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications / D. Klemm, K. Petzold-Welcke, F. Kramer [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2021. – Vol. 254. – P. 117313.

84. Burn wound infections: A serious threat of multidrug-resistant Staphylococcus aureus / K. Junaidi, A.U. Mustafa, S. Arshadm [et al.] // Pak. J. Med. Health Sci. – 2019. – Vol. 13, № 3. – P. 804.

85. Catanzano, O. Wound dressings as growth factor delivery platforms for chronic wound healing / O. Catanzano, F. Quaglia, J.S. Boateng // Expert Opin. Drug Deliv. – 2021. – Vol. 18. – P. 737-759.

86. CELL 157 - Application of Bacterial Cellulose in Treatment of Second- and Third-Degree burns / W. Czaja, M. Kawecki, A. Krystynowicz, K. Wysota, S. Sakiel, P. Wroblewski [et al.] // 227th ACS Natl. Meet. - Anaheim, 2004.

87. Characterization and cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluations of bacterial cellulose membranes incorporated with ciprofloxacin: A potential material for use as therapeutic contact lens / M. Cavicchioli, C.T. Corso, F. Coelho [et al.] // World J Pharm Sci. – 2015. – Vol. 4, № 7. – P. 1626-47.

88. Chitin-based double network hydrogel as potential superficial soft tissue repairing material / J. Huang, M. Frauenlob, Y. Shibata [et al.] // Biomacromolecules. – 2020. – Vol. 21. – P. 4220-4230.

89. Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: Preparation and characterization studies / M.L. Cacicedo, G. Pacheco, G.A. Islan [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 147. – P. 1136-1145.

90. Choi, S.M. The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications / S.M. Choi, E.J. Shin // Nanomaterials. – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 406.

91. Ciolacu, D.E. Cellulose-based Hydrogels as Sustained Drug-Delivery Systems / D.E. Ciolacu, R. Nicu, F. Ciolacu // Materials. – 2020. – Vol. 13, № 22. – P. 5270.

92. Collagen/hyaluronan based hydrogels releasing sulfated hyaluronan improve dermal wound healing in diabetic mice via reducing inflammatory macrophage activity / S. Hauck, P. Zager, N. Halfter [et al.] //Bioact Mater. – 2021. –Vol.6, №12. – P.4342-59.

93. Comparable effect of adipose-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells for wound healing: An in vitro study / K. Karina, I. Rosadi, S. Sobariah [et al.] // Biomed. Res. Ther. – 2019. – Vol. 6. – P. 3412-3421.

94. Construction of Small-Diameter Vascular Graft by Shape-Memory and Self-Rolling Bacterial Cellu lose Membrane / Y. Li, K. Jiang, J. Feng [et al.] // Adv. Healthcare Mater. – 2017. – Vol. 6. – P. 1601343.

95. Controlled Release and Antibacterial Activity of Tetracycline Hydrochloride-Loaded Bacterial Cellulose Composite Membranes / W. Shao, H. Liu, S. Wang [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2016. – Vol. 145. – P. 114-120.

96. Cost-effectiveness modeling of dermagraft for the treatment of diabetic foot ulcers in the french context / B. Allenet, F. Paree, T. Lebrun, L. Carr // Diabetes & Metabolism. – 2000. – Vol. 26(2). – P. 125-132.

97. Crystal and Supramolecular Structure of Bacterial Cellulose Hydrolyzed by Cellobiohydrolase from Scytalidium Candidum 3C: A Basis for Development of Biodegradable Wound Dressings / L.A. Ivanova, K.B. Ustinovich, T.V. Khamova [et al.] // Materials. – 2020. – Vol. 13, № 9. – P. 2087.

98. Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use / L. Montanaro, C.R. Arciola, E. Cenni [et al.] // Biomaterials. – 2000. – Vol. 22, № 1. – P. 59-66.

99. De novostrategy with engineering a multifunctional bacterial cellulose based dressing for rapid healing of infected wounds / C. Zhou, Z. Yang, X. Xun [et al.] // Bioact Mater. – 2022. – Vol. 13. – P. 212-222.

100. Del Valle, L.J. Hydrogels for Biomedical Applications: Cellulose, Chitosan, and Protein/Peptide Derivatives / L.J. Del Valle, A. Díaz, J. Puiggalí // Gels. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 27.

101. Demidova-Rice, T.N. Wound healing angiogenesis: Innovations and challenges in acute and chronic wound healing / T.N. Demidova-Rice, J.T. Durham, I.M. Herman // Adv. Wound Care. – 2012. - № 1. – P. 17-22.

102. Development of threedimensional bacterial cellulose/chitosan scaffolds: Analysis of cell-scaffold interaction for potential application in the diagnosis of ovarian cancer / M. Ul-Islam, F. Subhan, S.U. Islam [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 137. – P. 1050-1059.

103. Dourado, F. A Review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose / F. Dourado, M. Gama, A.C. Rodrigues // Toxicol Rep. – 2017. – Vol. 4. – P. 543-553.

104. Doxorubicin Embedded into Nanofibrillated Bacterial Cellulose (NFBC) Produces a Promising Therapeutic Outcome for Peritoneally Metastatic Gastric Cancer in Mice Models via Intraperitoneal Direct Injection / H. Ando, T. Mochizuki, A.S.A. Lila [et al.] // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11, № 7. – P. 1697.

105. Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds / P. Muangman, S. Opasanon, S. Suwanchot, O. Thangthed // J. Am. College Certified Wound Specialists. – 2011. – Vol. 3. – P. 16-19.

106. Elbadawy, A.K. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings / A.K. Elbadawy, S.K. El-Refaie, C. Xin // J. Adv. Res. – 2017. – Vol. 8. – P. 217-233.

107. Evaluation of donor site pain after fractional autologous full-thickness skin grafting / J.A. Jaller, I. Herskovits, L.J. Borda [et al.] // Adv. Wound Care. – 2018. – Vol. 7. – P. 309-314.

108. Evaluation of radiosterilized glyercerolated amniotic membranes as a substrate for cultured human epithelial cells / A.O. Paggiaro, M.B. Mathor, W.R. Teodoro [et al.] // Organogenesis. – 2020. – Vol. 16. – P. 27-41.

109. Ex vivo and in vivo Biocompatibility Assessment (bloodandtissue) of Three-Dimensional Bacterial Nanocellulose Biomaterials for Soft Tissue Implants / M. Osorio, A. Cañas, J. Puerta [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 10553.

110. Experimental Study of a New Original Mesh Developed for Pelvic Floor Reconstructive Surgery / F.-F. Ai, M. Mao, Y. Zhang, J. Kang, L. Zhu // Int. Urogynecol. J. – 2020. – Vol. 31, № 1. – P. 79-89.

111. Fabrication of bacterial cellulose-based wound dressings with improved performance by impregnation with alginate / I. Sulaeva, H. Hettegger, A. Bergen [et al.] // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. – 2020. – Vol. 110. – P.110619.

112. Fabrication of bacterial cellulose-collagen composite scaffolds and their osteogenic effect on human mesenchymal stem cells / Y.K. Noh, A. Dos Santos Da Costa, Y.S. Park [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2019. – Vol. 219. – P. 210-218.

113. Fabrication of cell penetrating peptide-conjugated bacterial cellulose nanofibrils with remarkable skin adhesion and water retention performance / S. Kim, J.Y. Kang, W.C. Balance [et al.] // Int J Pharm. – 2021. – Vol. 600. – P. 120476.

114. Farahani, M. Wound Healing: From Passive to Smart Dressings / M. Farahani, A. Shafiee // Adv. Healthc. Mater. – 2021. – Vol. 10. – P. 2100477.

115. Fathke, C. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: Collagen deposition and wound repair / C. Fathke // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22. – P. 813-822.

116. Flexible Bicolorimetric Polyacrylamide/Chitosan Hydrogels for Smart Real-Time Monitoring and Promotion of Wound Healing / K. Zheng, Y. Tong, S. Zhang [et al.] // Advanced Functional Materials. – 2021. – Vol. 31, № 34. – P. 2102599.

117. Formation of Pseudomonas aeruginosa Bioflms in Fullthickness Scald Burn Wounds in Rats / K.S. Brandenburg, A.J. Jr. Weaver, S.L.R. Karna [et al.] // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9. – P. 13627.

118. Wound dressings as growth factor delivery Frailty: An independent predictor of burns mortality following in patient admission / J. Ward, G. Philips, I. Radotra [et al.] // Burns. – 2018. – Vol. 44. – P. 1895-1902.

119. Frisman, I. Nanostructuring of PEG-fibrinogen polymeric scaffolds / I. Frisman, D. Seliktar, H. Bianco-Peled // Acta Biomater. – 2010. – Vol. 6. – P. 2518-2524.

120. From Residues to Added-Value Bacterial Biopolymers as Nanomaterials for Biomedical Applications / F.G. Blanco, N. Hernández, V. Rivero-Buceta [et al.] // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11, № 6. – P. 1492.

121. Frykberg, R.G.C. Challenges in the treatment of chronic wounds / R.G.C. Frykberg, J. Banks // Adv. Wound Care. – 2015. – Vol. 4. – P. 560-582.

122. Functional skin grafts: Where biomaterials meet stem cells / A. Kaur, S. Midha, S. Giri, S. Mohanty // Stem Cell Int. – 2019. – 2019. – P. 1286054.

123. Functionalized Magnetic Bacterial Cellulose Beads as Carrier for Lecitase Ultra Immobilization / R. Drozd, M. Szymańska, R. Rakoczy [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2019. – V.187, № 1. – P.176-193.

124. Goodwin, N.S. The efficacy of hydrogel dressings as a first aid measure for burn wound management in the pre-hospital setting: A systematic review of the literature / N.S. Goodwin, A. Spinks, J. Wasiak // Int. Wound J. – 2015. – Vol. 3. – P. 519-525.

125. Gorgieva, S. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications / S. Gorgieva, J. Trček // Nanomaterials. – 2019. – Vol. 9, № 10. – P. 1352.

126. Greenhalgh, D.G. Management of Burns / D.G. Greenhalgh // N. Eng. J. Med. – 2019. – Vol. 380. – P. 2349-2359.

127. Gupta, D.K. Thin and ultra-thin split thickness skin grafts (STSG-UT, STSG-T) / D.K. Gupta // Gupta, D.K. Mikroskin Grafting for Vitiligo / D.K. Gupta. - Springer; London, UK: 2009. - P. 15-18.

128. Highly Stretchable, Adhesive, Biocompatible, and Antibacterial Hydrogel Dressings for Wound Healing / Z. Yang, R. Huang, B. Zheng [et al.] // Adv. Sci. – 2021. – Vol. 8, № 8. – P. 2003627.

129. Hyalomatrix: A temporary epidermal barrier, hyaluronan delivery and neodermis induction system for keratinocyte stem cell therapy / S. Myers, V. Partha, C. Soranzo [et al.] // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13. – P. 2733-2741.

130. Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets / J. Larouche, S. Sheoran, K. Maruyama, M.M. Martino // Adv. Wound Care. – 2018. – Vol. 7. – P. 209-231.

131. Immunological challenges associated with artificial skin grafts: Available solutions and stem cells in future design of synthetic skin / S. Dixit, D.R. Baganizi, R. Sahu [et al.] // J. Biol. Eng. – 2017. – Vol. 11. – P. 123-140.

132. Immunomodulatory Effects of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells Promote Alternative Activation Macrophages to Repair Tissue Damage / A.C. Bowles, R.M. Wise, B.Y. Gerstein [et al.] // Stem Cells. – 2017. – Vol. 35, № 10. – P. 2198-2207.

133. Implantation of Air-Dried Bacterial Nanocellulose Conduits in a Small-Caliber Vascular Prosthesis Rabbit Model / L. Bao, F.F. Hong, G. Li [et al.] // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. – 2021. – Vol. 122. – P. 111922.

134. Improved thermostability and cytocompatibility of bacterial cellulose/collagen composite by collagen fibrillogenesis / L. Dai, J. Nan, X. Tu [et al.] // Cellulose. – 2019. – Vol. 26, № 11. – P. 6713-6724.

135. In Situ controllable Fabrication of Porous Bacterial Cellulose / H. Zhang, X. Xu, C. Chen [et al.] // Mater. Lett. – 2019. – Vol. 249. – P. 104-107.

136. In Situ Synthesized Selenium Nanoparticles-Decorated Bacterial Cellulose/Gelatin Hydrogel with Enhanced Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Capabilities for Facilitating Skin Wound Healing / L. Mao, L. Wang, M. Zhang [et al.] // Adv. Healthcare Mater. – 2021. – Vol. 10. – P. 2100402.

137. In vitro analysis of the potential cartilage implant bacterial nanocellulose using the bovine cartilage punch model / V. Horbert, P. Foehr, F. Kramer [et al.] // Cellulose. – 2019. – Vol. 26. – P. 631-645.

138. In vitro hemo- and cytocompatibility of bacterial nanocelluose small diameter vascular grafts: Impact of fabrication and surface characteristics / M. Wacker, V. Kießwetter, I. lottosch [et al.] // PLoS One. – 2020. – Vol. 15, № 6. – P. e0235168.

139. In vivo soft tissue reinforcement with bacterial nanocellulose / I. Anton-Sales, S. Roig-Sanchez, K. Traeger [et al.] // Biomater. Sci. – 2021. – Vol. 9. – P. 3040-3050.

140. Inselman, D.W. Bacterially derived medical devices: How commercialization of bacterial nanocellulose and other biofabricated products requires challenging of standard industrial practices / D.W. Inselman, C.J. Medberry, W.K. Czaja // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2021. – Vol. 109, № 11. – P. 193-195.

141. Investigation on artificial blood vessels prepared frombacterial cellulose / S. Zang, R. Zhang, H. Chen [et al.] // Mater Sci Eng C. – 2015. – Vol. 46. – P. 111-117.

142. Khurshid, A. Acellular fish skin grafts for management of split thickness donor sites and partial thickness burns: A case series / A. Khurshid, S.L.A. Steven // Mil. Med. – 2019. – Vol. 184. – P. 16-20.

143. Kocik, J., Udział cytokin i innych mediatorów w procesie gojenia rany / J. Kocik // Postępy Biol. Komórki. – 1996. – Vol. 23. – P. 63-92.

144. Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production / R.T.A. Machado, A.B. Meneguin, R.M. Sabio [et al.] // Ind Crops Prod. – 2018. – Vol. 122. – P. 637-46.

145. Kushwaha, A. Nanomaterial-based therapy for wound healing / A. Kushwaha, L. Goswami, B.S. Kim // Nanomater. – 2022. – Vol. 12, № 4. – P. 618.

146. Latest advances on bacterial cellulose-based materials for wound healing, delivery systems and tissue engineering / T. Carvalho, G. Guedes, F.L. Sousa [et al.] // Biotechnology J. – 2019. – Vol. 14, № 12. – P. e1900059.

147. Studies on bacterial cellulose/poly(vinyl alcohol) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma / Y. Han, C. Li, Q. Cai [et al] // Biomed Mater. – 2020. – Vol.15, N 3. – P. 035022.

148. Mandour, Y.M.H. Bacterial cellulose graft versus fat graft in closure of tympanic membrane perforation / Y.M.H. Mandour, S. Mohammed, M.o.A. Menem // Am. J. Otolaryngol. – 2019. – Vol. 40. – P. 168-172.

149. Mechanical Evaluation of Bacterial Nanocellulose as an Implant Material for Ear Cartilage Replacement / L. Nimeskern, H. Martínez Ávila, J. Sundberg [et al.] // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2013. – Vol. 22. – P. 12-21.

150. Mezzana, P. Clinical efficacy of new chitin nanofibrils-based gel in wound healing / P. Mezzana // Acta Chir. Plast. – 2008. – Vol. 50(3). – P.81-84.

151. Microbiology and antibiotic resistance in severe burns patients: A 5-year review in an adult burn’s unit / I.A. Bahemia, A. Muganza, R. Moore [et al.] // Burns. – 2015. – Vol. 41. – P. 1536-1542.

152. Milstone, L.M. Growth factor expression, healing and structural characterisitcs of graftskin (Apligraf®) / L.M. Milstone, M.M. Asgari, P.M. Schwartz // Wounds. – 2000. – Vol. 12. – P. 12A-19A.

153. Modification of Bacterial Cellulose with Quaternary Ammonium Compounds Based on Fatty Acids and Amino Acids and the Effect on Antimicrobial Activity / A.

Zywicka, K. Fijalkowski, A.F. Junka [et al.] // Biomacromolecules. – 2018. – Vol. 19, № 5. – P. 1528-1538.

154. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites / K-Y. Lee, G. Buldum, A. Mantalaris, A. Bismarck // Macromol Biosci. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 10-32.

155. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment / T. Hakkarainen, R. Koivuniemi, M. Kosonen [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2016. – Vol. 244. – P. 292-301.

156. Nanomaterials for wound healing and infection control / M.M. Mihai, M.B. Dima, B. Dima, A.M. Holban // Materials. – 2019. – Vol. 12, № 13. – P. 2176.

157. Nathoo, R. Skin substitutes: An overview of the key players in wound management / R. Nathoo, N. Howe, G. Cohen // J. Clin. Aesthet. Dermatol. – 2014. – Vol.7. – P. 44-48.

158. Naturally-occurring Bacterial Cellulose-Hyperbranched Cationic Polysaccharide derivative/MMP-9 siRNA Composite Dressing for Wound Healing Enhancement in Diabetic Rats / N. Li, L. Yang, C. Pan [et al.] // Acta Biomater. – 2020. – Vol. 102. – P. 298-314.

159. Nechita, P. Xylan Hemicellulose: a Renewable material with potential properties for food packaging applications /P. Nechita, R. Mirela, F. Ciolacu // Sustainability. – 2021 –Vol. 13, №24. – P. 13504.

160. Nessler, M. Możliwości zastosowania ksenogenicznych substytutów skóry w leczeniu oparzeń–przegląd piśmiennictwa / M. Nessler, A. Chrapusta // Leczenie Ran. – 2013. – № 10. – P. 47-52.

161. New Methods Modified Bacterial Cellulose Tubes for Regeneration of Damaged Peripheral Nerves / K. Kowalska-Ludwicka, J. Cala, B. Grobelski [et al.] // Arch Med Sci. – 2013. – Vol. 3. – P. 527-534.

162. Niculescu, A-G. An up-to-date review of biomaterials application in wound management / A-G. Niculescu, A.M. Grumezescu // Polymer. – 2022. – Vol. 14, № 3. – P. 421.

163. Novel chitosan/agarose/hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications: Comprehensive of biocompatibility and osteoinductivity with the use of osteoblasts and mesenchymal stem cells / P. Kazimierczak, A. Benko, M. Nocun, A. Przekora // Int. J. Nanomed. – 2019. – Vol. 14. – P. 6615-6630.

164. Patency and in vivo compatibility of bacterial nanocellulose grafts as small-diameter vascular substitute / C. Weber, S. Reinhardt, K. Eghbalzadeh [et al] // J Vasc Surg. – 2018. – Vol. 68, N6S. – P. 177S-187S.

165. Poonguzhali, R. Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application / R. Poonguzhali, S.K. Basha, V.S. Kumari // Int J Biol Macromol. – 2017. – Vol. 105(Pt 1). – P. 111-120.

166. Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter hansenii using corn steep liquor as nutrient sources / A.F.S. Costa, F.C.G. Almeida, G.M. Vinhas, L.A. Sarubbo // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 20-27.

167. Production of Conductive Bacterial Cellulose-Polyaniline Membranes in the Presence of Metal Salts / H. Kim, J. Eun Song, C. Silva, H.R. Kim // Textile Res. J. – 2020. – Vol. 90. – P. 1517-1526.

168. Surface modification of bacterial cellulose for biomedical applications / T. Aditya, J.P. Allain, C. Jaramillo, A.M. Restrepo // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23(2). – P. 610.

169. Synthesis of a novel acrylated abietic acid-g-bacterial cellulose hydrogel by gamma irradiation / M.M. Abeer, M.C.I.M. Amin, A.M. Lazim, M. Pandey [et al.] // Carbohydr Polym. – 2014. – Vol. 110(38). – P. 505-512.

170. Treatment of partial-thickness burns: A prospective, randomized trial using transcyte / R.J. Kumar, R.M. Kimble, R. Boots, S.R. Pegg // ANZ J. Surg. – 2004. – Vol. 74. – P. 622-626.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Патент РФ № 2704474 Способ создания глубокого ожога кожи у крыс в эксперименте

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2815760

Способ создания глубокого ожога кожи у крыс в эксперименте

Патентообладатель: ***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Алтайский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)***

Авторы: ***Жариков Андрей Николаевич (RU), Алиев Александр Руштиевич (RU), Мазко Олеся Николаевна (RU), Макарова Олеся Геннадьевна (RU), Орлова Ольга Владимировна (RU)***

Заявка № **2023126921**
Приоритет изобретения **18 октября 2023 г.**
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **21 марта 2024 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **18 октября 2043 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов