

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ОЛЕШКО ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ

УДК: 616.5-001-002-089.844:547.995

АНАТОМО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
ВИКОРИСТАННЯ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН ДЛЯ ПЛАСТИКИ
МЕХАНІЧНИХ ДЕФЕКТІВ ШКІРИ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

Спеціальність 14.03.01 – нормальна анатомія

ДИСЕРТАЦІЯ
на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник –
Погорелов Максим Володимирович,
доктор медичних наук, доцент

Суми – 2017

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1 Структура і властивості хітину та хітозану.....	10
1.2 Застосування хітину та хітозану в медицині і тканинній інженерії.....	16
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	38
2.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових плівок.....	38
2.2 Дослідження впливу хітозанових плівок на регенерацію механічного дефекту шкіри.....	41
РОЗДІЛ 3 МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ШКІРИ КОНТРОЛЬНОЇ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СЕРІЙ ТВАРИН.....	47
3.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових плівок.....	47
3.2 Особливості планіметричних показників ділянки шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії	55
3.3 Особливості показників цитології ділянки травми шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії	65
3.4 Зміни гістологічної будови та морфометричних параметрів ділянки шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії..	88
3.5 Вивчення мікробіологічних показників поверхні рани ділянки шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії	109
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	120
ВИСНОВКИ.....	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	136
ДОДАТОК А.....	165
ДОДАТОК Б.....	177

ВСТУП

Актуальність теми

Шкіра є зовнішнім покривом людського тіла, що здійснює взаємозв'язок з навколишнім середовищем. Сумарна площа шкірного покриву дорослої людини становить 1,6 – 2,3 м², маса досягає 5 кг, а з підшкірною жировою клітковиною – 20 кг, що становить 4 – 6 і 16 – 17 % від загальної маси тіла відповідно [253]. За кількістю (10^{11}) та щільністю клітин (6 млн/см²) шкіра є найбільшим органом людини [1].

Ушкодження шкіри займають одне з перших місць у структурі загального травматизму [2]. Так, за даними ВООЗ щорічно у світі одержують травми більше ніж 50 млн осіб, реєструється понад 25 млн випадків звернень із рубцями та рубцевими деформаціями. Велика кількість травм шкіри пов'язана зі стрімким розвитком виробництва, зріс відсоток побутових травм, щороку майже вдвічі збільшується кількість ДТП, які в 75 % випадків супроводжуються травмами шкіри [3]. У мирний час приблизно 40% поранень пов'язане з транспортною травмою – в Україні щорічна кількість потерпілих від ДТП близько 35 000. Також важливе значення набули травми в зоні проведення АТО – близько 80% всіх поранень супроводжується значним пошкодженням зовнішнього покриву.

Рановий процес – це сукупність послідовних змін, що відбуваються у рані, і пов'язаних із ними реакцій усього організму, спрямованих на відмежування вогнища травматичної деструкції, видалення патологічних субстратів і ліквідацію наслідків пошкодження. Місцеві реакції на травму практично в усіх випадках обумовлені взаємодією двох факторів: наявністю вогнища тканинної деструкції та мікробної контамінації [4]. Комплекс локальних порушень у вигляді розладів мікроциркуляції, порушення обмінних процесів під дією хімічних медіаторів запалення, прогресуючої гіпоксії і ряду інших факторів обумовлюють розвиток ацидозу, гіперкаліємії та збільшення осмотичного тиску в тканинах. У результаті зростає гіпергідратація тканин, що, у свою чергу, приводить до розвитку і поширення первинного чи вторинного некрозу, останній здебільшого поєднаний із розвитком гнійних

процесів [5]. Несвоєчасне надання медичної допомоги чи недосконале лікування механічних ран шкіри може призвести до розвитку посттравматичних ускладнень, таких як: кровотеча, приєднання інфекційних процесів на локальному, а потім і загальному рівні, розвиток гнійно-запальних захворювань, які у свою чергу, приводять до формування рубцевих деформацій із подальшою частковою чи навіть повною втратою функцій органа [6].

Питання оптимізації процесів репаративної регенерації м'яких тканин є одним з актуальних і остаточно не вирішених у сучасній науці [7]. На сучасному етапі розвитку медицини оптимізація загоєння ушкоджень, спричинених механічними діями (садна, рани, оперативні втручання), дією крайніх температур (опіки, обмороження) та іншими пошкоджувальними факторами (гнійно-запальні процеси, потертості, попрілості, дистрофічні порушення), залишається актуальним науково-практичним завданням. У зв'язку з тим, що штучно синтезованим лікарським засобам властиві різні прояви побічних ефектів, розроблення нових біосумісних матеріалів для використання під час лікування механічних ушкоджень шкіри та їх дослідження на експериментальних моделях є актуальними медико-біологічними проблемами.

Сучасна світова медицина має цілий арсенал різноманітних матеріалів для використання при травмах шкіри різного ступеня та локалізації [8]. На жаль, в Україні майже не використовуються подібні матеріали, а вартість існуючих обмежує їх призначення для більшості верств населення. Тому, аналізуючи методи лікування ран та сучасний перелік медичних засобів, можна стверджувати, що ідеальний матеріал для лікування пошкоджень шкіри повинен бути нетоксичним, апірогенним, не мати подразнювальної та антигенної дії, забезпечувати підтримку вологого середовища в рані, бути бар'єром для мікроорганізмів або мати антимікробні властивості, бути проникним для газів та стимулювати процеси регенерації [9].

Останніми роками збільшилася кількість досліджень щодо можливості застосування як основи для біологічно активних матеріалів хітозану, який є

похідним природного полімеру хітину. Хітозан володіє цілим рядом властивостей, що обумовлюють його використання як матеріалу для пластики дефектів шкіри – відновлюваність ресурсів, відсутність токсичності, апірогенність, гемостатичні та бактеріостатичні властивості, біосумісність та біодеградацію. Також цей матеріал здатний стимулювати процеси регенерації та перешкоджати утворенню рубців [10, 11]. За даними Bottomley et al., матеріали на основі хітозану можуть також стимулювати секрецію медіаторів запалення, таких як інтерлейкін-8, простагландин E, інтерлейкін-1 β тощо [12]. Публікації останніх років свідчать про використання хітозану як одного зі складників біоматеріалів. Так, на сьогодні є дані щодо виробництва на основі даного матеріалу гідрогелів [13], мембран [14], нановолокон [15, 16], мікро- й наночастинок [17, 18, 255] та губок [19].

Проте дотепер залишаються актуальними питання щодо вивчення впливу матеріалів на основі хітозану на перебіг репаративної регенерації шкіри та можливості розроблення нових підходів чи методик з метою удосконалення лікування механічних травм.

Вивчення анатомо-морфологічних особливостей регенеративних процесів на основі планіметричних, гістоморфометричних, цитологічних, мікробіологічних та інших сучасних методів досліджень дозволить підтвердити особливості фізико-хімічних властивостей і відсутність цитотоксичності хітозанових матеріалів, а також дасть можливість розробити нові методики та підходи щодо стимуляції процесів репаративної регенерації з метою покращання лікування механічних пошкоджень шкіри.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Сумського державного університету та є складовою частиною науково-дослідної теми Сумського державного університету «Медико-біологічні та доклінічні дослідження нових біоматеріалів медичного призначення на основі хітозану» (номер держреєстрації 60115U001712). Автор дисертації виконував дослідження в рамках гранту ДФФД № Ф44/445-2012 «Розроблення та доклінічні дослідження нанокompозитних матеріалів для медицини».

Мета і завдання дослідження

Метою дослідження було вивчення особливостей будови ділянки шкіри щурів при використанні хітозанових мембран для пластики механічних дефектів зовнішнього покриву у віковому аспекті.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Дослідити фізико-хімічні властивості та цитотоксичність хітозанових плівок різного складу з метою вибору оптимального засобу для пластики дефектів шкіри.
2. Вивчити особливості планіметричних, цитологічних і мікробіологічних показників, а також гістологічної будови шкіри в різні терміни загоєння у тварин контрольної серії після механічної травми.
3. Визначити особливості планіметрії та цитологічних показників поверхні ділянки шкіри у тварин різних вікових груп при застосуванні хітозанових плівок.
4. Вивчити зміни гістологічної будови та морфометричних параметрів ділянки шкіри у тварин різних вікових груп під час застосування хітозанових плівок.
5. Установити особливості мікробіологічних показників поверхні рани шкіри тварин за умов застосування хітозанових мембран у різні терміни загоєння рани.

Об'єкт дослідження – репаративна регенерація шкіри.

Предмет дослідження – морфологічні зміни регенерату шкіри тварин різного віку при механічній травмі та використанні хітозанових мембран.

Методи дослідження: дослідження фізико-хімічних властивостей (сорбція, РЕМ, інфрачервона спектроскопія) та цитотоксичності (культура клітин) хітозанових плівок, планіметрія ранової поверхні, цитологічне дослідження, гістологічне дослідження, морфометричне дослідження, мікробіологічне дослідження поверхні механічної рани, статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів

За допомогою сучасних методів дослідження було вперше вивчено особливості репаративної регенерації шкіри за умов її механічної травми на

основі фаз ранового процесу у віковому аспекті. Була зафіксована чітка відмінність швидкості рубцювання з віком, що підтверджує уповільнення регенераторних процесів у щурів старечого та, навпаки, активацію – у молодих, порівняно з тваринами зрілого віку.

Вперше було виявлено достовірну різницю між традиційними підходами та застосуванням хітозанових мембран із метою лікування механічних ран шкіри. Експериментальні покриття одержали більш виражений терапевтичний ефект. Отже, хітозан підсилює макрофагальну реакцію, що свідчить про активацію функції фагоцитозу, що у свою чергу, приводить до зменшення мікробної контамінації механічної рани. Зменшення площі поверхні дефекту при застосуванні хітозану достовірно вище, ніж без використання лікарських засобів. Цитологічне дослідження показало, що застосування хітозану сприяє швидшому переходу фази запалення у фазу регенерації.

Уперше встановлено, що при загоєнні ран шкіри під впливом хітозану відбувається швидке формування грануляційної тканини з добре розвиненим мікроциркуляторним руслом, великою кількістю і поліморфізмом клітин і волокнистих структур. Прискорення процесів диференціювання тканинних елементів сприяє утворенню шару горизонтально орієнтованих фіброblastів, більш ранній трансформації сполучної тканини, посиленню процесів епітелізації та контракції рани, що приводить до утворення органоспецифічного регенерату.

Практичне значення одержаних результатів

Виконані комплексні дослідження характеризують морфофункціональні зміни шкіри в процесі репаративної регенерації за умов застосування хітозану. Представлені матеріали можуть бути використані як обґрунтування для подальшого дослідження матеріалів на основі хітозану з метою створення лікарських препаратів – стимуляторів репаративної регенерації шкіри.

Результати цих досліджень дозволили визначити різницю та особливості показників регенераторних процесів шкіри тварин за умов механічної рани, що може бути використане як морфологічне підґрунтя в експериментальній медицині й біології, зокрема нормальній та патологічній анатомії, фізіології,

експериментальній хірургії, гістології та для розроблення новітніх способів лікування механічних травм шкіри.

Результати експериментальних досліджень упроваджені в навчальний процес на кафедрах: анатомії людини імені М. Г. Туркевича ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», Запорізького державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; нормальної анатомії людини Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; гістології, цитології та ембріології Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; патологічної анатомії з секційним курсом ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України; в наукову роботу лабораторії морфології сполучної тканини ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України».

Особистий внесок здобувача

Дисертантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних джерел за темою наукового дослідження, визначено мету та завдання дослідження. Автором розроблено та затверджено патент на корисну модель механічної рани у лабораторних тварин, проведено постановку експерименту, забір матеріалу, здійснені аналіз та статистична обробка одержаних результатів, оформлення їх у вигляді графіків і таблиць, сформульовані висновки, підготовлені наукові матеріали до публікацій та виступів на конференціях. Морфологічні, мікробіологічні, морфометричні, планіметричні, цитологічні та дослідження з визначення фізико-хімічних властивостей проведені особисто здобувачем. Дослідження з використанням культур клітин проведені в рамках співпраці з Шеффільдським університетом (Великобританія), результати дослідження опрацьовані особисто дисертантом.

Апробація результатів дисертації

Основні матеріали дисертації повідомлені та обговорені на таких конференціях і конгресах: Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» (Суми, 10–12 квітня 2013 р.), Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених, присвяченій 20-річчю медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 18–19 квітня 2013 р.), 6-му міжнародному студентському медичному конгресі «6th International Student Medical Congress in Košice (Кошице, Словаччина, 25 – 27 червня 2014 р.), II Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (Суми, 16–18 квітня 2014 р.), науково-практичній конференції «Морфологічні дослідження – виклики сучасності» (23–24 квітня 2015 р.), 8-му Міжнародному студентському медичному конгресі «8th International Student Medical Congress in Košice (Кошице, Словаччина, 22 – 24 червня 2016 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, з яких 8 статей – у наукових фахових виданнях, рекомендованих ДАК МОН України для медичних наук (зокрема, 2 – одноосібні, 1 – оглядового характеру), 1 – у науковому журналі, що індексується Sci Verse Scopus, 2 – патенти на корисну модель, 6 праць – у матеріалах з'їздів, конференцій.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Структура і властивості хітину та хітозану

Полісахариди як клас природних макромолекул є надзвичайно біологічно активними, а за умови отримання шляхом перероблення біотехнологічних відходів, сільськогосподарської сировини чи решток ракоподібних ще й надзвичайно доступними. Загалом хітину в природі не менше, ніж целюлози, і за необхідності об'єм його синтезу може досягати 10 гігатон за 1 рік [19]. Перспективно застосування хітозану як деацетильованого похідного хітину може реалізовуватися за різними напрямками, наприклад у кулінарії, матеріалознавстві, біотехнологіях, фармацевтичній галузі, сільському господарстві та охороні довкілля [20, 21]. Біомедичне і терапевтичне значення похідних хітину та хітозану є предметом наукових дискусій в усьому світі. Адже наявність чистих катіонів та множинних функціональних груп у молекулах хітозану дає можливість розцінювати останній як перспективний матеріал для маніпуляцій із метою отримання широкого спектра похідних для конкретних кінцевих застосувань у різноманітних галузях.

Хітин та хітозан є лінійними полісахаридами, що складаються з двох мономерних ланок, а саме: N-ацетил-2-аміно-2-дезоксид-D-глюкози (N-ацетильовані групи) і залишків 2-аміно-2-дезоксид-D-глюкози (N-деацетильовані групи, так звані аміногрупи). Молекули хітину містять меншу кількість N-ацетильованих груп, а отже, хітин менш розчинний у кислих розчинниках. У структурі хітозану, навпаки, відзначається менша кількість аміногруп, це й є підтвердженням того, що останній порівняно швидко розчиняється в кислому середовищі [22].

Більшість авторів вважають, що кількість аміногруп у структурі хітину повинна бути меншою за 60 %, а хітозану відповідно – більшою за 60 % [23].

Жорсткість та щільність структури хітину та хітозану забезпечують β -1,4 – зв'язки. Наявність численних гідроксильних груп (одна первинна

гідроксильна група в положенні С-6 і одна вторинна – в положенні С-3), аміногруп (у С-2) або їх N-ацетил-аналогів із тенденцією проникнення в середину молекули, а також водневих зв'язків приводить до формування лінійних сполучень зі значною кристалізацією. Остання сприяє посиленню міцності структури хітину. Також, теоретично, сукупність вищеперелічених факторів дає можливість не вступати в реакції зі звичайними розчинниками, зокрема водою при нейтральному рН.

У природі хітин існує в трьох різних поліморфних формах: α , β і γ , причому необхідно відзначити ймовірну наявність мінливих властивостей. Джерелом α -форм можуть бути краби і креветки, β -форм – молюски та γ -форм – кальмари відповідно. Всі три форми різняться між собою лише структурою полімерного ланцюга. Для α -форм характерне антипаралельне розміщення ланцюгів один відносно іншого, для β -форм – паралельне, а для γ -форм – відповідно хаотичне розміщення. Причому в утворенні структури полімеру γ -форм беруть участь два паралельно та один антипаралельно розміщені ланцюги [20]. Хітозан – це де-N-ацетильований аналог хітину, що є гетерополісахаридом та складається з лінійно β -1,4-зв'язаних субодиниць. Склад та послідовність цих блоків будуть визначати фізико-хімічні та біологічні властивості полімеру. Гетерогенні умови під час деацетилювання забезпечують послідовний розподіл ацетильних груп [21].

Хітин та хітозан мають різноманітні напрямки застосування: в тканинній інженерії [24, 25, 26], при загоєнні ран [27, 28 29, 30, 31], як основа для доставки лікарських засобів [32, 33] та в генній інженерії [34]. Однією з переваг цих полімерів є можливість використання в різних медикаментозних формах. Наприклад, гелях [35], мембранах [36, 37], нановолокнах [38], нанофібрилах [39], драже [40], мікрочастинках [41], наночастинках [42], каркасах [43, 44] і губчастій формі [45].

Хітин може бути використаний як біоматеріал у двох основних напрямках: як біологічно стабільний або як модифікований біодеградуючий матеріал [22, 46]. Через відсутність «немодифікованої» природної тривимірної структури хітину було зроблено кілька спроб оброблення губчастих матеріалів

з потенційним застосування в тканинній інженерії [22, 47]. Останніми роками були опубліковані кілька статей, що стосуються вивчення цитоархітекtonіки хітину та його застосування в тканинній інженерії [47, 23, 37, 48–50].

Крім біомедичного використання, особливості структури хітину дають можливість використання у промисловості з метою створення каталізаторів шляхом напилення металу [51]. Для цього необхідно дотримуватися таких умов: температура близько 300 °С, а рН середовища – від 1 до 12 [52]. Також тривимірні конструкції на основі хітину мають великий потенціал функціональної активності при нанесенні на певну поверхню (кальцифікація) [53, 54].

Окрім морських губок, хітин синтезують із різноманітних морських безхребетних [50, 55]. Також джерелом для одержання хітину можуть бути: морські форамініфери [56], діатомові водорості [57], гідроїди, кишковопорожнинні, брахіоподи – морські безхребетні тварини [58], погонофори [59, 60], молюски [61, 62], а також ракоподібні [63]. Ракоподібні є основним джерелом хітину. Загалом річний об'єм синтезу хітину з планктонних біосистем Світового океану становить щонайменше 2,3 мільйона кубічних тон [56].

Найбільш значним джерелом хітину є панцир крабів – *Callinectes sapidus* [64] і *Chionoecetes opilio* [65] та креветок – *Pandalus borealis*, *Crangon crangon* та *Penaeus monodon* [66, 67]. Панцир каракатиць *Salvia officinalis* містить 24 % хітину [68], в той час як кальмарів чи восьминогів – лише 3 – 20 % [69]. Хітин, що отримують із морських безхребетних, набув практичного застосування у виготовленні штучної шкіри, контактних лінз, хірургічного шовного матеріалу, гемостатичних препаратів [63], в онкології [70] та в різних медико-біологічних аспектах [71, 72].

Такі властивості хітину та хітозану, як розчинність, в'язкість і біосумісність, обернено пропорційні ступеню ацетилювання. Біодеградація прямо пропорційна ступеню ацетилювання та обернено пропорційна молекулярній масі [20, 21, 73–75].

Біологічні властивості, такі як антимікробна та кровоспинна дія, знеболювальний ефект також залежать від ступеня ацетилювання. Крім того, всі ці функції набувають більшого значення зі збільшенням молекулярної маси [74, 75]. Таким чином, можна зробити висновок про те, що ступінь N-ацетилювання, кристалічність, біодеградація і молекулярна маса значною мірою впливають на фізико-хімічні та біологічні властивості матеріалів із хітину та хітозану.

Використання хітину та його похідних у медицині та біоінженерії обумовлено наявністю ряду ефектів, таких як антибактеріальний, антиоксидантний, кровоспинний, стимуляція процесів регенерації та інші.

Наявність (1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-глюкозамінових залишків, або так званої аміногрупи, дає можливість охарактеризувати більшість властивостей хітозану. Здатність хітозану посилювати мукоадгезію пояснюється наявністю негативно заряджених частинок сіалової кислоти, які стимулюють комплекс: муцин-глікопротеїн, що, у свою чергу, є основою у процесі формування мокроти. У кислому середовищі аміногрупи хітозану заряджаються позитивно, а отже, можуть взаємодіяти з муцином. Такий варіант мукоадгезії безпосередньо пов'язаний зі ступенем деацетилювання хітозану. Адже чим він вищий, тим більша кількість позитивних зарядів, що приводить до поліпшення мукоадгезивних властивостей чи загалом самого процесу мукоадгезії [74].

Гемостатична активність хітозану також пов'язана з наявністю позитивних зарядів в основі його структури. А саме негативно заряджені мембрани еритроцитів крові взаємодіють з аміногрупами хітозану, що мають протилежний заряд. Крім того, ця тенденція підтверджується на основі одержаних результатів досліджень, в яких було доведено меншу гемостатичну активність хітину порівняно з хітозаном за рахунок нижчого ступеня деацетилювання, порівнюючи з останнім [76].

Здатність позитивних зарядів хітозану взаємодіяти з негативно зарядженими мембранами клітин, у результаті якої відбуваються реорганізація та послаблення щільних білкових зв'язків, пояснює ефект покращання проникності клітин при застосуванні даного полісахариду. Отже, збільшення

ступеня деацетилювання хітозану приводить до покращання внутрішньоклітинної проникності [77].

Розглянувши два варіанти взаємодії хітозану та клітин, можна зробити висновок щодо високої антибактеріальної та протигрибкової активності природного полісахариду. Отже, перший запропонований механізм описує явище впливу позитивних зарядів хітозану на негативні заряди поверхні клітин бактерій і, як наслідок, – зміну її проникності, що дозволить запобігти потраплянню в середину клітин чи призведе до втрати важливих продуктів життєдіяльності мікроорганізмів. Інший механізм пояснює зв'язування аміногруп хітозану з ДНК клітини, що може привести до пригнічення синтезу мікробного РНК. Вплив того чи іншого механізму або навіть їх комбінація дає ґрунтовну характеристику високої антибактеріальної та протигрибкової активності хітозану [78].

Полікатионна природа хітозану пояснює його знеболювальний ефект. Аміногрупи деацетилюваних глюкозамінових залишків можуть змінювати активність іонів протонів, що виділяються в ділянці запалення. У результаті такої взаємодії відбувається знеболювання ураженої ділянки [79].

Явище біодеградації в природних умовах пояснюється тим, що хітозан є не лише полімером, у складі якого наявні аміногрупи, а й полісахаридом, глюкозилізовані зв'язки якого зазнають руйнації. У природних умовах цим процесам сприяє декілька протеаз, але в основному хітинази [20]. Біодеградація хітозану супроводжується утворенням нетоксичних олігосахаридів. Ці структури вступають у реакції метаболічних процесів та в подальшому виводяться з організму [80]. Швидкість біодеградації хітозану пов'язана з параметрами молекулярної маси та періоду розпаду N-ацетил-D-глюкозамінових залишків, але здебільшого залежить від ступеня деацетилювання [81].

Для того щоб пояснити зв'язок між ступенем деацетилювання хітозану та його біодеградацією, важливо пам'ятати, що хітозан є напівкристалічним полімером. Показник кристалічності та рівень деацетилювання прямо пропорційні один одному та прирівнюються до числових значень від 0 до

100 %. Проте ступінь кристалічності полімеру зворотно залежить від кінетичної біодеградації. Тобто при зменшенні рівня деацетилювання, наприклад до 60 %, ступінь його кристалічності також зменшується, що приводить до збільшення швидкості біодеградації. Крім того, розподіл ацетильованих залишків уздовж молекули хітозану також впливає на його ступінь кристалічності, а отже, швидкість біодеградації. Виходячи з цього, можна зробити припущення, що дрібні ланцюжки хітозану будуть швидше деградувати до олігосахаридів, ніж хітозан із більш високою молекулярною масою.

Беручи до уваги всі вищезгадані властивості, не дивно, що хітозан є предметом багатьох досліджень медико-біологічних і фармацевтичних спрямувань. Зокрема, з метою виготовлення на його основі шовного матеріалу, зубних чи кісткових імплантатів, а також у трансплантології, з метою заміщення дефектів шкіри [20]. У рамках цих досліджень хітозан показав значну біосумісність [21].

Проте біосумісність хітозану у фізіологічному середовищі залежить від способу одержання. Адже залишкові білки дійсно можуть викликати алергічні реакції. Також доведено, що біосумісність прямо пропорційна ступеню деацетилювання. У результаті проведених *in vitro* досліджень було доведено, що біосумісність хітозану значно краща порівняно з хітином. Адже при збільшенні кількості позитивних зарядів збільшується взаємодія з клітинами, що приводить до поліпшення біологічної взаємодії [82].

Але описуються випадки токсичного впливу в результаті хімічних модифікацій хітозану [83].

З вищезазначеного можна зробити висновок, що хітозан є перспективним матеріалом для подальшого вивчення та застосування з метою виготовлення 3D-структур із подальшим використанням у тканинній інженерії чи 2D-покривів як лікувального перев'язувального матеріалу у разі пошкоджень шкіри.

1.2 Застосування хітину та хітозану в медицині і тканинній інженерії

Тканинна інженерія є фундаментальним підходом для відновлення пошкоджених чи зруйнованих тканин і органів. «Золотим стандартом» лікування є аутотрансплантація чи алотрансплантація. Проте обмежена доступність, ризик інфікування, післяопераційні ускладнення чи відторгнення трансплантата, а також висока вартість є стримувальними факторами в подальшому вивченні цього напрямку. Швидкий прогрес тканинної інженерії сприяє заміні тканини чи органа на клітинному рівні на біоматеріал, що відповідає фізіологічним та біохімічним вимогам. Таким чином, покращуються післяопераційні показники порівняно з аутотрансплантацією та алотрансплантацією. Різні полімери, кераміка або їх комбінації досліджуються в різних аспектах тканинної інженерії. Серед багатьох природних і синтетичних полімерів, які використовують на цей час, хітин і хітозан мають кращі перспективи у галузі біоінженерії. Тканинну інженерію можна поділити на декілька сегментів залежно від типу тканин та органів, таких як кісткова, хрящова і нервова тканини, а також зв'язки, сухожилля, печінка та регенерація шкіри.

Найбільш значущою сферою тканинної інженерії у зв'язку зі значним попитом та цікавістю як дослідників, так і клініцистів із метою відновлення опорно-рухового апарату за допомогою штучних матеріалів є кісткова інженерія. Кістковий скелет є основою людського тіла та виконує безліч життєвоважливих функцій. Кістки складаються з клітин, органічної та неорганічної матриці. Неорганічна матриця складається з вуглецевого гідроксиапатиту, а органічна – з колагену і додаткових факторів росту та неколагенових білків [84].

Біоматеріали, які використовують для розроблення каркасної матриці, вміщують полімери (природні або синтетичні), природно-синтетичні полімерні суміші, керамічні або полімер-керамічні композиційні матеріали [85]. Хоча хітинові та хітозанові матриці мають такі переваги, як біодеградація, біосумісність, легкість обробки, гнучкість та пористість [86];

вони є механічно слабкими та нестійкими. Отже, хітинові чи хітозанові полімерні суміші еволюціонували як краща альтернатива для підвищення механічної міцності скафолдів та використовуються за остеоіндуктивні матриці [87]. Зокрема, на сьогодні отримана хітозан-альгінатна гібридна структура, яка дала можливість одержати пористість із безкомпромісною механічною міцністю, що витримує значну силу стискання чи розриву. Це підвищення механічної міцності пов'язане із сильним іонним зв'язком між хітозаном та альгінатом. Аналогічним чином, механічна міцність хітозану була покращена методом додавання полі-лактат-ко-гліколевої кислоти (PLGA). Пористі хітозанові PLGA-матеріали, в основі каркаса яких містяться мікросфери, були одержані під дією високих температур на відміну від традиційної технології сухого висушування, яка, як вважалося, знижувала механічну міцність. Отже, значні температури та експозиція дії під час висушування сприяють підвищенню механічної міцності, однак зменшують діаметр пор структури каркаса [88].

Після комбінованого температурного оброблення отриманий модифікований хітозан-PLGA – комплекс дав можливість прискорити утворення кісткової тканини і сповільнення деградації матеріалу в природних умовах. Крім того, рекомбінантний людський кістковий морфогенетичний білок-2 (rhBMP-2) був пов'язаний із гепарином для посилення проліферації та диференціювання остеобластів, таким чином стимулюючи швидке утворення кісткової тканини. Під час аналізу в природних умовах було відзначено, що хітозан-PLGA – скафолд деградує впродовж шести тижнів, що призводило до хронічної запальної реакції, яка, у свою чергу, ускладнювала утворення та мінералізацію кісткової тканини. Навпаки, синергічна дія гепарину і rhBMP-2 сприяє утворенню сполучної тканини, що в подальшому стимулює мінералізацію та приводить до утворення кісткової тканини. Таким чином, це дослідження підтвердило важливість остеоіндуктивних факторів, гепарину та rhBMP-2 у посиленні остеоінтеграції та формування кісткової тканини порівняно з остеоіндуктивною хітозан-PLGA – матрицею [89].

Аналогічним чином одержуються різні модифікації хітозанових скафолдів, таких як аргінін-гліцин-аспарагінова кислота (RGD) – УФ-зшита, модифікована хітозановими субстратами [90], BMP-2 і кістковий морфогенетичний білок-7 (BMP-7), полімерні нанокapsули, інкапсульовані волокнистими скафолдами хітозану [91], полікапролактон (PCL) – ліофілізовані хітозанові скафолди [92], PCL-хітозанові структури, отримані шляхом розплавлення та багатошарового осадження [93], тромбоцитарний фактор росту (PDGF-BB), позбавлений пористості матриць PCL-хітозану [94], rhBMP-2-PLGA – мікросфери, завантажені хітозан-колагеновими скафолдами [95], гепарин-модифіковані хітозанові скафолди [96], хітозан-полі(бутилен-сукцинат) (PBS)-каркаси, одержані шляхом змішування його похідних [97], α - і β -хітозанові мембрани [36], розроблені з метою покращання регенерації кісткової тканини. Мапо та ін. також розробили полі(L-молочну кислоту) PLLA-хітозанові гібридні каркаси для полегшення регенерації кісткової тканини. Проте вони викликали прекальцифікацію шляхом замочування скафолдів у розчинах Ca^{2+} та PO_4^{3-} для покращання остеоіндуктивних властивостей [98].

Гідроксіапатит $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ є основним неорганічним компонентом кісток і зубів. Його синтетичні аналоги дуже подібні за структурою, а отже, є одним із найбільш потрібних біокерамічних матеріалів для застосування в ортопедії та стоматології. НАР або наноНАР використовується як покриття металевих імплантатів або як полімерні композиційні керамічні матриці в галузі кісткової і тканинної інженерії [99]. Наприклад, у результаті поєднання наноНАР із гідрогелем хітину було одержано кращі механічні властивості матеріалу і структуру, максимально подібну до природної кістки [100]. Sudheesh Kumar et al. та Madhumathi et al. повідомляють про придатність застосування в тканинній інженерії скафолдів на основі поєднань наноНАР та α - або β -хітин-гідрогелю чи хітозанового гідрогелю [101, 102]. Li et al. повідомляють про розроблення наноНАР/колаген/PLLA – скафолдів, зміцнених хітиновими нановолокнами для підвищення механічної міцності [103]. У подібних дослідженнях був отриманий матеріал на основі скафолдів

НАР-хітозанових нановолокон із подальшим додаванням геніпіну методом електроспінінгу [104], НАР, мінералізований хітозановими мембранами методом подвійної дифузії [37]. У структурі цих попередньо мінералізованих хітозанових мембран виявились однорідні та чітко визначені кристали НАР, що відрізнялися від аналогічних кристалів неправильної форми, одержаних більш традиційними методами біомінералізації, такими як штучна міжклітинна речовина (SBF) або преципітація [36]. Також існують численні комбінації матеріалів хітину, хітозану, карбогідроксіапатиту з іншими полімерами чи керамічними матеріалами, такими як хітозан-полілактат [105], шовк та його похідні [106], карбоксиметил целюлоза [107], вуглецеві нанотрубки (CNT) [108] і желатин [109].

Ge et al. повідомляють про актуальність остеогенного підходу до регенерації кісткової тканини на відміну від остеокондуктивного чи остеоіндуктивного. Остеобласти, одержані шляхом диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), були висіяні на матрицю хітин-НАР та імплантовані в дефекти стегнової кістки кроликів. Через два місяці було проаналізовано результат кісткової проліферації в експериментальний матеріал та виявилось, що швидкість заміщення дефекту була кращою, ніж у контрольній групі. Адгезія та проліферація клітин у пористу структуру матриці хітин-НАР були на високому рівні та за результатами термінів регенерації кісткової тканини в природних умовах виявилися кращими [110]. Існують дослідження, спрямовані на вдосконалення структури та властивостей полімерів шляхом покращання механічних властивостей без зміни структури пор, біодеградації та біомінералізації, клітинної адгезії, проліферації й диференціації, що необхідно для успішної регенерації і відновлення кісткової тканини.

Хоча карбогідроксіапатит і є природним компонентом кісткової тканини та зубів, він має кілька обмежень, таких як повільна швидкість резорбції, що робить його більш привабливим для нарощування кісткової тканини, а не регенерації [111]. Для того щоб подолати обмеження НАРу, необхідно знайти альтернативний біоактивний керамічний матеріал. Larry Hench у 1967 році

виявив досить значну біологічну активність склокераміки чи біоскла (BGC) типу 45S5, які мають здатність зчеплення з твердими та м'якими тканинами шляхом напилення гідроксикарбонатного апатиту методом електроспінінгу [112]. BGC є альтернативною заміною НАР за відсутності будь-яких інших остеоіндуктивних факторів, таких як білки або фактори росту.

BGC також стимулює ангиогенез [113] та поділяється на два типи [114]. Клас А – остеопродуктивний. На поверхні твердих і м'яких тканин кістки шар гідроксиапатиту утворюється впродовж 1 години. Клас В – остеокондуктивний. Шар НАР формується від одного до декількох днів і лише на поверхні твердих тканин кісток.

BGC синтезується за допомогою різних методів. Поетапне розплавлення та синтезування гелеподібних основ є одними з найбільш часто використовуваних методів. На додаток до типу 45S5 існує кілька модифікацій, таких як 58s, 77s, 13-93, Perioglas, 6P53B, 70S30C, Ceravital, Novabone [113]. Шар, багатий на діоксид кремнію, покращує осадження шару аморфного фосфату кальцію (CaP), який згодом кристалізується в шар карбогідроксиапатиту [114]. Ці біологічно активні матеріали на основі кераміки також мають певні недоліки, такі як механічна слабкість та низький опір до руйнування, що обмежують його застосування в певних галузях. Проте їх композитні чи нанокompозитні сполуки можуть використовуватись як основи з подальшим додаванням модифікованих матеріалів. В інших джерелах можна знайти інформацію щодо існування хітин-хітозан-BGC композитних матеріалів, що містять нанобіоскло, гідрогель α - та β -хітинових структур та nBGC, комбінований зі скафолдами хітинових нанокompозитів [115, 116], антибактеріальні та біоактивні nBGC із частинками наносрібла (nAg) на основі гідрогелю α - і β -хітинових структур [111], мікро- та наноBGC – сполуки на основі хітозанових мембран, одержані шляхом сорбції [117], PCL/хітозан/nBGC- і PCL/CS/nНАР-каркасні структури [117], хітозан-желатин/nBGC – скафолди [119], хітозанові гібридні скафолди в поєднанні з полівініловими спиртами та біоактивним керамосклом [120], що використовуються в тканинній інженерії в галузі ортопедії та стоматології. В

інших джерелах є інформація про існування модифікованих апатит-керамічних скломатеріалів, на які поверхнево нанесено хітозан, для того щоб підвищити їх механічну міцність, покращити біосумісність і деградацію без зміни пористої структури [121].

Подібно до BGC є також біокомпозитні матеріали на основі хітину та хітозану в поєднанні з оксидами кремнію, титану і цирконію, що використовуються в остеопластиці та для регенерації кісткової тканини методом нарощування. Кілька прикладів, нановолокна хітозан-поліетиленоксид (PEO) з діоксидом кремнію (SiO_2) [122], нанокомпозит НАРхітозан- SiO_2 [123], матеріали з поєднанням хітину та SiO_2 [124], скафолди НАР-оксид титану, хітозан желатину [125], композитні структури хітину, хітозану та нано-діоксиду титану [126], хітин цирконію [127], хітин-хітозан/нанооксиду цирконію, композитні жорсткі волокнисті структури [50].

Тканинна інженерія в галузі регенерації хрящової тканини спрямована на швидке та повноцінне відновлення пошкодженої ділянки без утворення рубцевої тканини і втрати функцій. Griffon et al. у ході дослідження, що тривало впродовж 4 тижнів, довели довготривалу взаємодію сполучної тканини та хітозанових скафолдів [128]. Збільшення кількості хондроцитів у зразку хітозанових скафолдів було одержано шляхом трансформації фактора росту β (TGF- β). Проте проліферація хондроцитів та хітозанових скафолдів була меншою порівняно з контрольними зразками [129]. У дослідженнях з культивування хондроцитів кролика на поверхні хітозанколагенової структури з приєднанням геніпіну одержаний результат свідчив про відсутність диференціювання, проте виражену проліферацію клітин [130]. Куо et al. продемонстрували ефект залежності механічної міцності та хондрогенезу за умов культивування клітин на трикомпонентній структурі: хітин, хітозан та поліетиленоксид (PEO). Максимальний модуль Юнга свідчить про рівномірне співвідношення хітину та хітозану у структурі скафолдів [131]. Кровоспинний ефект хітозану був підтверджений в результаті проведених досліджень, коли в остеохондральній ділянці створювали дефект, що впродовж 8 тижнів був заміщений гіаліновим хрящем, формування якого свідчить про міграцію та

диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в умовах дії хітозану на згусток крові [132]. Ін'єкційні гідрогелі на основі хітину та хітозану показали гарні результати щодо впливу на регенерацію хряща завдяки подібності до екстрацелюлярного матриксу. При безпосередньому вприскуванні хітозану у місце дефекту хряща щурів у різних хімічних модифікаціях – одержали кращі результати проліферації хітозанових структур та ЕСМ. Для прискорення регенерації тканин було залучено модифікації полімерів, таких як хондроїтин-сульфофосфат та гідроксіапатит, та одержано підвищений рівень інфільтрації хондроцитів і зменшення терміну загоєння ран [133]. Були розроблені ін'єкційні гідрогелі на основі хітозану з урахуванням відношення молекулярної маси, концентрації та часу гелеутворення. Стабільний фотополімеризуючий гідрогель був розроблений в умовах приєднання до гліколевомодифікованого хітозану метакрилату гліколю. Кінцевий варіант сполуки утворюється після фіксування в фотополімеризуючому розчині. Диференціювання хондроцитів відбувається майже у 80 % випадків за умови, що гідрогель хітозану є природним екстрацелюлярним матриксом, тим самим підвищуючи проліферацію хондроцитів вушного хряща в лакунах хітозанових скафолдів [133]. Наносферична 3D-структура хітозан-сульфат-хондроїтину була отримана шляхом пошарового поєднання поліелектролітів із подальшим видаленням лужних залишків шляхом парафінування. Унікальний дизайн при додаванні до взаємопроникних пор хондрогенного середовища та умов посиленої дегідратації дозволив одержати значне диференціювання мезенхімальних стромальних клітин, тим самим імітувавши природний хрящ. При додаванні фактора росту можна одержати умови прискореного диференціювання та функціонування хондроцитів [134]. Дослідження, проведені в умовах приєднання екстрацелюлярного матриксу до нановолокон хітозанового скафолда довели можливість стимуляції хондрогенезу на етапі диференціювання клітин. [25, 135]. Після розробки двох варіантів 3D-структури хітозан-гідроксиапатиту – циліндричної та у формі кульки – проведено дослідження щодо лікувального ефекту шляхом заміщення дефекту

вушного хряща кролика даними структурами. Було доведено значний прогрес у процесі регенерації штучно одержаних дефектів хрящової тканини [136]. Гібридний волокнистий каркас, отриманий шляхом поєднання хітозану та полікапролактону за умов високої температури, одержав кращі показники щодо механічної цілісності порівняно з природними тканинами, а також довів перспективу подальших досліджень у напрямку збільшення концентрації хітозану в модифікованих полімерах [137]. За умов ліквідації основного недоліку модифікованих наноструктур, а саме тривалого періоду культивування клітин у наносферах конструкції, полімери на основі 3D-пористої структури зможуть забезпечити ідеальну вологість для регенерації хрящових тканин та заповнити просторові недоліки дефекту за рахунок 3D-конструкції, а також забезпечити механічну міцність за рахунок волокнистої сітки, термін біодеградації якої відповідає періодам хондрогенезу. Ліквідація недоліків та поєднання всіх переваг є основними рушійними силами перспективних досліджень і вивчень майбутнього.

Сухожилля та зв'язки складаються з гіпоцелюлярних тканин, що, у свою чергу, свідчить про залежність успішного загоювання від анатомічного розміщення, васкуляризації та об'єму пошкодженої тканини [138, 139]. Аутологічні підходи в лікуванні, що залишаються «золотим стандартом», часто призводять до утворення рубцевої тканини. Тому сучасні методи лікування необхідно спрямовувати в галузь тканинної інженерії, цим самим включати інноваційні методи регенерації. З урахуванням анатомічних та фізіологічних особливостей будови зв'язок та сухожиль необхідно зазначити, що перспективні дослідження тканинної інженерії повинні бути спрямовані на розроблення матеріалів, які могли б виконувати такі самі функції та були б схильні до стимуляції регенераторних процесів. Якщо брати до уваги те, що синтетичним матеріалам необхідно буде забезпечити силу та підтримку тканин організму, то основним критерієм відбору можна вважати високу міцність на розрив. Хітозанові волокна, отримані методом електроспінінгу, відповідають цим критеріям. Адже поліелектролітний комплекс на основі комбінації хітозану та альгінату поліпшує фіксацію клітин регенерату на

волокон за рахунок стимуляції адгезії тромбоцитів [140]. В інших дослідженнях було доведено ефективне покращання показників міцності та якості фіксації клітин за умов використання хітозанових волокон із гідроксиапатитним напленням [141]. Авторами було доведено ефективність взаємодії в процесі регенерації тканинного каскаду та композитних хітозан-гідроксиапатитних волокон. В експерименті на кроликах на синтетичний замітник сухожилка було осаджено клітини колагенових волокон I-го типу. Повноцінна регенерація втрачених тканин довела можливість використання композитних хітозанових волокон я матриці, навколо якої й починаються регенераторні процеси [142]. Сполучнотканинне рубцювання на поверхні хітинових волокон, модифікованих осадженням колагену, за рахунок клітинної інфільтрації підтверджує активну участь хітинових волокон у процесах регенерації сухожилків [143]. Проте швидка деградація хітинових волокон в *in vivo* умовах, призводить до втрати механічної міцності дефектної частини сухожилля. І лише комбінований полімерний композит полікапролактону на основі хітину відновлює механічну міцність та не змінює природної регенерації тканин сухожилків [144]. В *in vitro* умовах були проведені дослідження з метою вивчення впливу хітозану на швидкість відкладення колагену за умов наявності такого контролювального фактора, як трансформуючий ростковий фактор β . Проведені дослідження підтвердили роль хітозану в зниженні активності ТРФ- β , тим самим сприяючи відкладанню колагену I-го типу. Більш швидке відновлення зв'язок в експериментальній групі тварин завдяки деградації хітозану в природних умовах, що була швидшою, ніж регенерація тканин, підтверджує рівень впливу хітозану [144]. Для повноцінної регенерації необхідний контрольований ріст теноцитів по довжині волокон із подальшим відкладанням колагену I-го типу, який і є основною складовою сухожилля. Застосування пористих хітозанових структур, що мають мікроходи, з додатково осадженим колагеном I-го типу, дало можливість комплексно покращити процеси регенерації, а саме прискорити ріст теноцитів та відкладання колагену I-го типу [145]. Контрольований ріст клітин уздовж стресового вектора відтворює природні

умови динамічного стану сухожилля. Тобто динамічні умови культивування покращують регенерацію та відкладання колагену I-го типу одночасно. Архітектура скафолдів також відіграє важливу роль. Описані випадки комбінування N-метилкрилату гліколю хітозану та ϵ -PCLDLLA методом фотополімеризації [146]. Цей напрям тканинної інженерії спрямований на покращання регенераторних процесів шляхом створення додаткових мікроканалів або шляхом створення мікрОВОЛОКНИСТОЇ поверхні для більш швидкої інфільтрації та проліферації клітин регенерату.

Хітин та хітозан широко використовуються в тканинній інженерії з метою прискорення процесів регенерації тканин та синтезу колагену фібробластиами [147, 148]. Волокниста структура хітозану, сприяючи інфільтрації поліморфно-ядерних клітин у місце пошкодження, приводить до більш швидкого загоєння ран [149]. Наявність основного фактора росту фіброblastів у структурі хітозану також приводить до більш швидкої регенерації тканин у рані [150]. Існують випадки одержання поліелектролітних мембран із поєднанням альгінату на основі хітозану [151]. Цей тип мембран достатньо міцний навіть за зміни рН. При їх застосуванні за умов моделювання дефекту щурам одержано результати більш швидкого загоєння ран [152]. Використання біосумісного пористого колагенового каркасу на основі хітозану приводить до інфільтрації фіброblastів із сумісно розміщених тканин, що є показником повноцінної регенерації [153]. В інших дослідженнях для лікування інфікованих ран на поверхні тіла мишей використовували пов'язки з хітозан-ацетатом. З одержаних результатів можна зробити висновок, що використання хітозан-ацетату приводить до значного зниження запальних клітин у рані та підсилює регенерацію пошкоджених тканин [154]. В іншому дослідженні при застосуванні силіконової композитної мембрани на основі N,N,N-триметилхлориду хітозану відзначається інкапсуляція судинного ендотеліального фактора росту-165, що кодує ДНК. Цей ефект застосовується з метою лікування глибоких опіків шкіри [155]. Існують джерела, що свідчать про розроблення хітозанового гелю з ателоколагеном для поліпшення загоєння ексцизійних ран [156]. Застосування матричного

композитного гелю приводить до покращання фіксації, міграції та проліферації клітин, а також відкладання колагену. Цікаво відзначити, що в цьому разі відзначається підвищення рівня фактора росту, що пов'язано з підвищенням рівня антиоксидантів та зниженням перекисного окиснення ліпідів. Результати засвідчили, що застосування колагенового гелю на основі хітозану приводить до більш швидкого формування нової тканини, максимально подібної до природного варіанта [156]. Аналогічно, хітозанові колагенові мембрани були отримані шляхом дегідратації за умов високих температур, та при нанесенні на всю поверхню ран у кроликів відзначалася прискорена регенерація шкіри [157]. Мікропористі хітозанові желатинові композитні каркаси були розроблені для кращої адгезії фібробластів. Композиція з 1-(3-диметил-амінопропіл)-3-етил-карбодімід карбоксилхлорид є найбільш придатним для використання у лікуванні шкірних пошкоджень. Крім того, щоб імітувати епідермальну структуру, кератиноцити напилювали на желатинову основу біогелю хітозану. Таким чином, комбінаторний підхід сприятиме одночасній регенерації дермального та епідермального шарів шкіри [158]. У рамках покращення загоєння ран та розширення спектрів тканинної інженерії був розроблений композитний бандаж із нанофібрином на основі гідрогелю хітозану [124]. Отриманий композитний бандаж є біосумісним із фібробластами шкіри людини та клітинами ендотеліального шару судин. В експерименті *in vivo* на моделях мишей було доведено, що при накладанні цих бандажів на рану прискорюються реепітелізація та відкладання колагену [159]. Отже, хітозан має унікальні фізико-хімічні та біологічні властивості. Крім того, композиційне поєднання з функціональними біомолекулами чи біоматеріалами дає можливість розвивати перспективні напрями тканинної інженерії.

Хітозанові скафолди в комбінації з 5-фторурацил виготовлені методом рідинного прядіння з метою застосування як імплантати-перевізники медикаментів. Унаслідок значної гідрофільності цього імплантата вивільнення потрібної речовини відбувається впродовж дуже короткого проміжку часу та потребує додаткового вивчення й удосконалення [160]. Lin та Yeh розробили

хітинові й хітозанові плівки пористої структури і пектинові скафолди в поєднанні з пентоксифіліном [161]. На відміну від попередньо описаних альгінатпоєднані аналогічні композити показали меншу здатність до набухання, більш низьке вивільнення пентоксифіліну, більшу механічну міцність і велику стійкість до ферментативної деградації. Ступінь деацетилювання становить 82 %, а сповільнене вивільнення пентоксифіліну спонукає для використання при запальних реакціях [161]. Також описується використання матеріалів на основі хітозану в поєднанні з циклодекстрином карбоксиметилцелюлозою [44]. Були проведені дослідження з використанням кетопрофену, в результаті яких дійшли висновку, що для ефективної доставки лікарських засобів найкращий варіант використання – це хітозан із середньою молекулярною масою від 2×10^4 . Такий ступінь деацетилювання 75 – 85 % [44]. Shi et al. виготовляли хітозанові покриття з гідроксиапатитом у поєднанні з ампіцеліном шляхом альгінатного емульгування. За рахунок пористого матриксу та досить контрольованої швидкості вивільнення модифіковані матеріали даного типу застосовували при пошкодженнях хрящової чи кісткової тканини [161]. Duarte et al. рекомендують використання модифікації хітозану з рівнем деацетилювання 85 % дексаметазоном із метою впливу на диференціювання стовбурових клітин остеогенної лінії [163]. Teng et al. вивчали можливість застосування хітозану зі ступенем деацетилювання 75 – 85 % в поєднанні з тетрацикліну гідрохлоридом у регенерації тканин [164]. Noel et al. вивчали *in vitro* антибактеріальні властивості хітозанових губок з амікацином та ванкоміцином, одержаних шляхом ліофілізації [165]. Були розроблені PLLA-хітозанові скафолди для тканинної інженерії в комбінації з кетопрофеном [166]. В інших працях описуються скафолди з кальцієм [167]. Fenbufen досліджував полілактат-гідроксиапатитхітозанові волокна, розроблені методом електроспінінгу [168]. Також наведені результати досліджень щодо застосування хітозанових мембран, модифікованих ніфедипіном та пропранололом, із метою трансдермального методу доставки лікарських засобів [169]. У деяких працях подано розроблення термочутливих мембран хітозану, поєданого з полілактидгліколідною кислотою. У даній

комбінації використаний хітозан із молекулярною масою $2,5 \times 10^5$ Да та ступенем деацетилювання 82,5 %, що може бути використаний як основа для медикаментозної терапії [170]. Li et al. досліджували використання N-алкілованих хітозанових мембран, модифікованих вітаміном B₂, шляхом окиснення за участі глюкози [171]. В іншій праці описуються мембрани на основі хітозану та геніпіну [172]. Також існують описані методи отримання комплексу хітозану зі ступенем деацетилювання 90 % в поєднанні з берберином. Із метою поєднання цих матеріалів був використаний метод іонних взаємодій за наявності альгінату натрію. Одержані мембрани набули значної термостабільності та дають можливість контрольованого вивільнення берберину [172]. З метою ліквідації всіх перепон на шляху лікування пошкодженої кісткової тканини були розроблені хітозанові плівки, поєднані з антибактеріальними препаратами [165]. Для одержання цих комплексів хітозановий розчин із попередньо доданими антибіотиками (амікацин або даптоміцин) відливали в плоскодонний скляний посуд із подальшим висушуванням за температури 37 °C упродовж 12 годин у сушильній шафі. In vitro дослідження показало швидке вивільнення лікарського засобу та високу бактеріостатичну дію одержаних плівок. Проте потрібні додаткові дослідження з метою визначення цитотоксичності та біодеградації одержаних матеріалів [165]. Були розроблені рН-чутливі хітозанові мембрани з лідокаїном шляхом впливу саліцилату натрію та хлористоводневої кислоти [173]. А комплекс хітозану та берберину, одержаний шляхом взаємодії з альгінатом натрію, довів досить високу термостабільність та контрольованість щодо вивільнення діючої речовини [174]. Thacharodi and Rao отримали механічно міцні, проте термолабільні плівки з пропанололгідрохлоридом за рахунок взаємодії хітозану та глютар альдегіду. Ці комплекси можуть бути використані як гідрофільні засоби [169]. Ці самі автори намагалися використовувати гідрофільність хітозанових мембран як гіпотензивну терапію після комбінації з ніфедипіном [175]. Продовжуючи цю роботу, хітозанові мембрани були використані як трансдермальна система доставки лікарських засобів (пропанолол-гідрохлорид). Із метою контрольованого вивільнення

окремі субодиниці даного комплексу з'єднали за допомогою глутаральдегіду [175]. Аналогічним методом були отримані комплекси з ніфедипіном [169]. В іншій праці мембрани з пропранолол-гідрохлоридом були використані як транспортна система, і вивчені властивості проникності композитних комплексів залежно від концентрації колагену та хітозану в мембранах [169]. Композиції плівок на основі хітозану в поєднанні з хлоргексидин-біглюконатом були використані як транспортна система для протигрибкової терапії ротової порожнини [176]. Carmen Remunan-Lopez et al. розробили двошарові комплекси з метою використання як транспортні системи. Ці композити були одержані за рахунок поєднання в результаті аніонних взаємодій хітозанового шару та етилцелюлози. Після додавання ніфедипіну та пропранололгідрохлориду цей тип двошарового комплексу використовувався як транспортна система, що давала можливість ліквідувати втрати діючої речовини внаслідок контакту з активною людською слиною [177]. Нанокompозитні хітозанові плівки після приєднання органічних компонентів (альбуміну сироватки крові великої рогатої худоби) приводять до більш контрольованого та безперервного вивільнення діючої речовини [178]. Tigli et al. розробили скафолди на основі хітозану та гідроксиапатиту, що дали можливість пролонгованому вивільненню діючої речовини під час лікування парадонта [179]. В результаті використання хітозану зі ступенем деацетилювання 85 % вчені змогли розробити модель капсульованої транспортної системи, що сприяє не лише контролюванню вивільнення діючої речовини, а й забезпечує пролонгований ефект [180, 181].

У цілому можна зробити висновок, що мембрани чи скафолди на основі хітину та хітозану або в комбінації з хітозан- β -циклодекстрином [69], пектином [182], гідроксиапатитом [170, 172], полілактатами молочної кислоти [168], колагеном [95, 168], альгінатом [174] можуть дати можливість одержання ефективної транспортної системи з метою доставки ліків, таких як 5-фторурацил [183], дексаметазон [163, 179], кетопрофен [44], пентоксифілін [182, 184, 167], тетрацикліну гідрохлорид [164], ампіцилін [162], фенбуфен [168], амікацин і ванкоміцин [165], інсулін [185], ванкоміцину гідрохлорид

[170], фосфат-бетаметазон натрію [170], ніфедипін та пропранололгідрохлорид [169], вітамін В2 [171], лідокаїн, саліцилат натрію, 4-ацетаміндофенол [173] чи берберин [174]. Крім того, мембрани та скафолди на основі хітину та хітозану сприяють активації фактора росту, а отже, беруть безпосередню участь у регенераторних процесах.

Велика кількість праць присвячена створенню матеріалів для лікування пошкоджень шкіри. Так, були розроблені хітинові мембрани, комбіновані розчином диметилацетаміду та хлориду літію. Ці покриття мають здатність до набухання, передавання вологи та високий антибактеріальний потенціал щодо грампозитивних і грамнегативних штамів мікроорганізмів. Проведені експерименти на морських свинках підтвердили відсутність запальної чи подразнювальної дії на шкіру тварин. Біосумісність цих покриттів було додатково підтверджено в експерименті під час проведення тесту Фінкельштейна на кроликах [186]. Ефективність загоєння ран після використання хітозанових мембран оцінювали в експерименті порівняно із застосуванням Vastigras-парафінізованих марлевих пов'язок з ацетатом хлоргексидину. На відміну від Vastigras застосування хітозанових мембран показало більш виражений позитивний контроль, підвищену реепітелізацію та регенерацію грануляційної тканини у пацієнтів [187]. Інші джерела також описують застосування хітозанових мембран. Порівняно з контрольною групою, було одержано покращені показники загоювання ран за такий короткий термін, як 1 тиждень. Також було доведено більшу ефективність використання порівняно з контролем у зв'язку зі швидшою реепітелізацією поверхні рани на фоні неушкодженого епідермального шару шкіри [187]. Pang et al. розробили композиційні мембрани, що складаються з трьох шарів (верхній шар був зроблений із хітозану, середній шар – полівініловий спирт та нарешті шар хітозану в поєднанні з карбоксиметилом, який є субстратом). Композитна мембрана показала достатню механічну міцність, високу антибактеріальну активність проти *Escherichia coli* та значний кровоспинний ефект. Розроблений матеріал цитосумісний із фібробластами шкіри людини [77]. Додавання сульфадіазину срібла до хітозанових мембран показало контрольоване

випаровування вологи, адекватну здатність до набухання, цитосумісність і тривалу антибактеріальну активність внаслідок контрольованого вивільнення сульфадіазину срібла [188]. Wang et al. оцінювали регенеративну здатність мембран на основі хітозану та поліелектролітних комплексів альгінату. Одержані покриття були нетоксичними стосовно фібробластів мишей та людини, а також порівняно з контролем показали більш швидку регенерацію [219]. Хітозан-альгінат-композитні мембрани мають високу міцність та адекватне подовження при розриві. Ці кінетичні показники автори змогли одержати при концентрації альгінату близько 50 % [190]. Mi et al. розробили двошарові хітозанові мембрани з поєднанням сульфадіазину срібла. Двошарові мембрани показали пролонговане вивільнення сульфадіазину срібла та високу антибактеріальну активність проти синьогнійної палички та золотистого стафілокока [191]. Marresco et al. аналізували вплив різних методів стерилізації на механічну міцність, структуру й цитотоксичність хітозанових мембран. Стерилізація відбувалася в результаті дії газоподібного етиленоксиду, гамма-опроміненням і методом занурення в 70 % розчин етилового спирту. З одержаних результатів був зроблений висновок про те, що стерилізація газоподібним етиленоксидом є найбільш придатним способом, а інші методи стерилізації надають цитотоксичності та змінюють структуру матеріалу [192]. Zhu et al. довели відсутність цитотоксичного впливу хітозанових мембран щодо фібробластів людини після оброблення аргонном. Ці маніпуляції поліпшили гідрофільність поверхні хітозанових мембран, що сприяло підвищенню адгезії та проліферації фібробластів [193]. Mizuno et al. повідомляють про використання хітозанових мембран, модифікованих основним фактором росту фібробластів при пошкодженнях шкіри мишей, хворих на діабет. Оцінювання результатів проводили на 5-й та 20-й дні. Порівняно з контрольними показниками застосування модифікованих хітозанових мембран привело до прискорення грануляції тканинного дефекту, тоді як проліферацію фібробластів і збільшення кількості капілярів спостерігали в обох групах [150]. Метод комбінування гідрогелю на основі лактату хітозану та полівінілових спиртів і фурациліну, за De Queiroz et al., дав

можливість отримати місцевий антибактеріальний засіб. В *in vitro* експерименті було оцінено такі властивості, як набухання, стійкий профіль вивільнення, відмінну механічну міцність. Проведення експериментів на лабораторних щурах є перспективою щодо можливості застосування цієї комбінації елементів як перев'язувальний матеріал [194]. Мі et al. збільшили пористість хітозанових мембран шляхом осадження методом фазної інверсії. Одержані результати відзначалися покращеними показниками контрольованої швидкості випаровування води. А в експериментах на щурах було доведено відмінний кровоспинний ефект та підвищену швидкість реепітелізації. Гістологічні дослідження підтвердили збільшену швидкість епітелізації та природне відкладання колагену в дермі після пошкодження шкіри щурів [195]. Тао et al. розробили антибактеріальну композицію на основі хітозану, меду та желатину. В експерименті на кроликах, що був проведений на території Нової Зеландії, було доведено біосумісність даного композита та більш швидке відновлення ушкодженої шкіри кролика порівняно зі зразками контрольної групи тварин [196]. В результаті поєднання β -хітину, поліетиленгліколю та сульфадіазину срібла одержані губки набули антибактеріальних властивостей та значної механічної міцності. В *in vivo* дослідженнях було доведено перспективу застосування цього матеріалу з лікувальною метою при пошкодженнях шкіри, адже порівняно з контролем застосування експериментального композита привело до більш швидкого загоєння ран поверхні шкіри тварин [197]. Також описуються дослідження з використанням перев'язувального матеріалу на основі α - та β -хітинових композитів, в яких була доведена антибактеріальна дія щодо грампозитивних золотистих стафілококів та грамнегативних кишкових паличок. Окрім згубної дії на мікроорганізми, ці матеріали продемонстрували високий коефіцієнт набухання, контрольовану біодеградацію та високу кровоспинну здатність. А також у даних дослідженнях було доведено, що перев'язувальний матеріал на основі α - та β -хітинових композитів є біосумісним та нетоксичним щодо клітин Vero [29, 198, 199]. Noel et al. описують використання хітозанових губок, поєднаних з антибактеріальними препаратами, як локальних систем

доставки лікарських засобів для додаткової терапії при лікуванні інфекційних процесів [165]. За даними інших джерел, губки, до основи яких додали желатин-альгінат, желатин-гіалуронат та хітозан-гіалуронат, використовували з метою лікування ран шкіри в *in vivo* умовах експерименту на лабораторних щурах Вістара. Результати досліджень засвідчили більш швидке загоєння ранового дефекту шкіри тварин експериментальної групи порівняно з аналогічними показниками контролю [200]. Sudheesh Kumar et al. повідомили про розроблення перев'язувальних матеріалів на основі гідрогелю хітозану та наночастинок цинку з метою використання при ранових дефектах шкіри. Підготовлені бандажі мають значний кровоспинний ефект у зв'язку з активацією тромбоцитів, а також згубно діють на такі мікроорганізми, як *S. aureus* та *E. Coli*. У лабораторних умовах було доведено більш швидке загоєння ран шкіри щурів Sprague – Dawley після використання експериментального перев'язувального матеріалу порівняно з контрольними показниками. Крім того, на місці дефектів, оброблених композитними сполуками, відбулася повна повторна епітелізація та були відсутні сполучнотканинні рубці. У ранах, оброблених композитними матеріалами, відбувалися більш швидке відкладання колагену та значно менше обсіменіння бактеріальною мікрофлорою порівняно з аналогічними контрольними показниками [201].

Композитний бандаж на основі гідрогелю хітозану та наночастинок цинку отримав мікропористу структуру та досить гнучку форму, що дає можливість поглинати великі об'єми рідини, таким чином абсорбуючи ексудат із поверхні рани, що особливо корисно в застосуванні при хронічних виразках діабетичної стопи. У дослідженнях також були доведені антибактеріальний ефект стосовно як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій та значна кровоспинна здатність, що дає можливість використання цих композитів під час кровотеч, а також пошкоджень шкіри. Адже в *in vitro* експериментах доведено, що на поверхні перев'язувального матеріалу на основі гідрогелю хітозану та наночастинок цинку відбувається інфільтрація фібробластів шкіри людини. Комбінація всіх переваг цього біокомпозита ставить на більш високе місце використання перев'язувального матеріалу на його основі, у

перспективних дослідженнях із метою покращання терапії шкірних дефектів [202]. У працях Sudheesh Kumar et al. також зазначається, що порівняно з контрольними показниками значно знижується кількість бактеріальних колоній та більш швидко відкладається колаген на поверхні рани при використанні пов'язок на основі гідрогелю хітозану та наночастинок цинку, які мають значну здатність до зміни форми та пористої структури [203]. В інших джерелах описується значне покращання регенерації поверхні дефектів шкіри у разі використання композитів, одержаних у результаті оброблення розчином хлористого гліцедилтриметиламонію суміші хітину та поліакрилової кислоти [204, 205]. Також повідомляється про створення комбінованого двошарового матеріалу, верхній шар якого містить хітиновий гідрогель із карбоксиметилом, а основа складається з хітозан-ацетату, просоченого хлоргексидину глюконатом. Цей матеріал був визнаний ефективним проти *P. aeruginosa* в *in vivo* експерименті, що тривав упродовж 7 днів. У товщі рани щурів лінії Вістар відзначалися більш низька кількість мікроорганізмів порівняно з контролем, а також значна проліферація фібробластів, що було доведено гістологічним методом дослідження [206]. Ratanajajaroen et al. повідомили про включення куркуміну до складу матеріалів на основі хітину та, вивчаючи подальше вивільнення куркуміну з композитної структури, довели залежність між початковою концентрацією й терміном екстрагування [207]. Окремо проведені дослідження підтверджують згубну дію на *S. aureus* та *E. Coli*. куркуміновмісних хітинових комплексів [208]. Дослідження Seong et al. повідомили про розроблення напіввзаємопроникних матеріалів, що складаються з β -хітину та поліетиленгліколю. Отримані мембрани показали значну міцність при розтягуванні та можуть бути використані для різних біомедичних застосувань [209]. В інших джерелах описується оцінювання ранозагоювального потенціалу композита на основі гідрогелю хітину та поліакрилової кислоти [210]. *In vitro* дослідження довели, що включення N,O-(карбоксиметил) хітозану до колагенової структури, що стала основою для безклітинної матриці з подальшим додаванням хондроїтин-сульфату, приводить до

посилення міграції фібробластів залежно від концентрації N,O-(карбоксиметил) хітозану. В *in vivo* експериментах було виявлено прискорення загоєння ран порівняно з контролем [211].

В окремому дослідженні повідомлялося про одержання плівок гідрогелю хітозану та полівінілалкоголю методом заморожування. В *in vivo* дослідженнях було доведено, що поєднання створених плівок із міноцикліном приводить до більш швидкого загоєння ран у лабораторних щурів порівняно з контролем. Як контроль були використані стерильні марлеві пов'язки з міноцикліном. Гістологічне дослідження експериментального матеріалу підтвердило тенденцію одержаних результатів [212].

Інші автори повідомляють про створення композитів на основі азинобензолних сполук хітозану. Отримані мембрани мали здатність виконувати бар'єрну функцію стосовно бактерій, у той час як кисень без будь-яких проблем проникав через товщу експериментальної мембрани в *in vitro* дослідженнях за умов культивування фібробластів шкіри та епідермальних кераноцитів [213].

Існують повідомлення про відсутність алергічних чи подразнювальних реакцій на основі тесту Draize за умов використання гідрогелю карбоксиметилхітозану чи поліакрилхітину [214].

Описується виражена антибактеріальна дія композитів на основі хітозану та геніпіну щодо бактеріальних видів *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) [215].

Описані дослідження використання біокомпозитних матеріалів на основі желатину, хітозану та поліелектролітного комплексу, синтезованих методом електроспінінгу, з антибактеріальною метою. Новий матеріал мав високу механічну міцність і пружність, у той час як його форма здатна до деформацій без прикладання значної сили. Одержані результати досліджень мають великі перспективи щодо подальшого вивчення цих біокомпозитів з метою вдосконалення перев'язувального матеріалу [216]. В іншій праці мембрани, що складаються з хітозану та колагену, були розроблені шляхом дегідрогенізації. Попередні дослідження довели відсутність

подразнювального впливу на клітини та в *in vivo* експериментах на кроликах показали підвищену ранозагоювальну здатність [157]. Chen et al. повідомили про розроблення термочутливого матеріалу, що стимулює регенерацію. Композит був одержаний шляхом поєднання волокон хітозану, акрилової кислоти та полі-N-ізопропілакриламідів. Поверхня поліпропілену була модифікована шляхом кон'югації акрилової кислоти. Після цього відбулося сполучення з хітозаном за умов використання карбодімідів. Отриманий матеріал мав гарну механічну міцність, здатний до набухання, а також проявляв антибактеріальну дію щодо золотистого стафілокока. Крім того, в експериментах *in vivo*, проведених на щурах лінії Sprague – Dawley було доведено більш швидке загоювання ран шкіри порівняно з контрольною групою тварин [217].

Dowling et al. повідомили про розроблення гідрофобно-модифікованих матеріалів, одержаних шляхом поєднання хітозану та 4-октадецилбензальдегіду методом поетапного висушування за умов низьких температур. Отримані матеріали були гідрофобними, що дало можливість ввести до їх структури клітини крові. Згортання крові було виключено додаванням α -циклодекстрину [218]. В іншій праці було одержано композитні плівки, що складаються з хітозану та поліетиленглікольфумарату. Отримані матеріали мають здатність до набухання, адекватну водопроникність та проявляють гарну антибактеріальну дію стосовно *P. aeruginosa* та *S. aureus*. Оцінювання цих властивостей було проведене на основі порівняльного аналізу співвідношень концентрацій складових. Ідеально скомпонований композит повинен складатися на 80 % із хітозану та на 20 % із поліетиленглікольфумарату [219]. Sudheesh Kumar et al. повідомили про розроблення гнучкого мікропористого композита на основі хітозанового гідрогелю та нановолокон фібрину [220]. Матеріал було одержано методом дифузії поверхнево-активних речовин [221].

Anisha et al. повідомили про розроблення трискладового композита на основі хітозану, гіалуронової кислоти та нанохондроїтину сульфату для використання в медичних цілях. Спосіб виготовлення композитної губки

передбачає іонне перехресне поєднання з подальшим сушінням та виморожуванням. Цей матеріал здатний адсорбувати вологу та стимулювати згортання крові. Також даний композит не є біотоксичним і здатен стимулювати проліферацію фібробластів шкіри людини. Автори наголошують на значній перспективі використання наноматеріалу в галузі медицини, з метою удосконалення перев'язувального матеріалу [222]. Інший метод отримання біокомпозитів на основі хітозану передбачає розчинення кератину в 75 % оцтовій кислоті з подальшим сполученням із хітозаном на поліпропіленовій прес-формі. Завершальним етапом є висушування за температури 50 °C упродовж 12 годин. Проліферація фібробластів на поверхні матеріалу відбувається безперешкодно, адже в експериментальних дослідженнях композит продемонстрував відмінну антибактеріальну здатність [223]. Біокомпозит, одержаний в результаті поєднання альгінату хітозану та поліелектролітного комплексу методом ліофільного висушування, не викликає імуногенних реакцій та сприяє швидкому загоєнню ран [224]. В інших працях описується отримання двошарових плівок із композиційного матеріалу. Верхній шар – соєвий білок, а нижній шар – хітозан з геніпіном. Ці плівки показали, що здатні стимулювати процеси реепітелізації в рані та антибактеріально впливати на мікроорганізми [225].

Таким чином, хітин та хітозан є основою для багатьох матеріалів, що використовуються для лікування пошкоджень шкіри, а також регенерації кісткової та хрящової тканин. Незважаючи на численні дослідження, питання оптимальної молекулярної маси, співвідношення компонентів, використання різних розчинників тощо для покращання процесів відновлення тканин із використанням матеріалів на основі хітозану залишаються відкритими. Також невивченими є питання впливу матеріалів на основі хітозану на регенерацію шкіри у різні вікові періоди.

Матеріали розділу опубліковано в праці [226].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності плівок

У роботі проводилося вивчення процесів регенерації шкіри тварин після механічної травми і застосування хітозанових плівок. Матеріал для покриття дефекту був одержаний у співпраці з Інститутом прикладної фізики НАН України (м. Суми). Для одержання гелю хітозану використовували хітозан із різною молекулярною масою (200, 500 та 700 кДа), одержаний із панцирів камчатських крабів без будь-яких домішок. Готували 2 % розчин хітозану в 0,5 % оцтовій кислоті впродовж 24 год, профільтрувавши його через скляний фільтр. рН одержаного гелю витримували не нижче 7.0. Гель формує тонку помірно розчинну у воді плівку на полімерній підкладці впродовж 10 хвилин. Для формування плівок товщиною більше 0,5–1,0 мм використовували тefлонові форми, час формування – від 1 до 3 діб.

Для одержання нерозчинної у водному середовищі плівки необхідна додаткове оброблення ранового покриття гідроксидом натрію (0,1 М розчин). Одержане таким чином покриття міцне та має високу адгезію до шкіри.

Дослідження плівок проводили з використанням таких методів:

1. Растрова електронна мікроскопія

Із метою визначення особливостей рельєфу поверхні та внутрішньої будови сформованих плівок проводили напилення зразків сріблом у стандартній вакуумній установці (ВУП-5) товщиною 40–50 нм. Дослідження зовнішньої поверхні мембрани та її профілю здійснювали на растровому мікроскопі PEMMA-102 (SELMІ, Україна) при збільшенні від 300 до 2 000 разів.

2. Інфрачервона спектроскопія

Інфрачервоні спектри матеріалу були отримані на інфрачервоному спектрометрі «Spectrum One» («Perkin Elmer»). Перед вимірюваннями зразки

змішували з порошком KBr (2,5–3,0 мг ChAp і 300 мг KBr) та пресували у тверду таблетку.

Вимірювання проводили за кімнатної температури. Для кожного спектра проводили 512 сканувань у спектральному діапазоні 4 000–400 см⁻¹ із роздільною здатністю 4 см⁻¹. Дані були оброблені за допомогою пакета програм Opus.

3. Визначення швидкості деградації плівок

Визначення швидкості біодеградації проводили шляхом поміщення плівки у розчин simulated body fluid (SBF) pH = 7,2 за температури 37 °C. Аналіз ранніх результатів проводили через 15, 30, 40 та 60 хв, віддалені результати деградації вивчали через 12, 24 та 48 годин після початку експерименту. Швидкість біодеградації D визначали за формулою

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

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

4. Визначення токсичності та біосумісності з використанням культур фібробластів

Зважаючи на те, що хітозанові плівки одержані з матеріалу з різною молекулярною масою – 200, 500, 700 кДа, було проведено дослідження плівок на культурі фібробластів для оцінювання адгезії та проліферації клітин на поверхні зразків.

Дослідження було проведено в лабораторії клітинної і тканинної інженерії Kroto Research Institute Шеффілдського університету (Великобританія), керівник лабораторії – др. Гвендолен Рейлі.

Для проведення дослідження з плівок були виготовлені диски діаметром 12 мм, які розміщені у 12-лунковому планшеті. Попередньо диски були простерилізовані у 100 % етанолі впродовж 1 години. На поверхню кожного диска було поміщено 50 000 клітин (фібробласти – OF). У кожен лунку додавали 2 мл модифікованого середовища Ігла (DMEM medium), планшет

поміщали в CO₂-інкубатор, заміну середовища здійснювали кожні 3 дні. Як позитивний контроль використовували культивування фібробластів на культуральному пластику (TCR), негативний – вільні від клітин диски з хітозановими плівками.

Оцінювання адгезії та росту фібробластів проводили за допомогою мікроскопії. Проліферацію оцінювали за допомогою тесту Alamar Blue на 3-тю, 7-му та 14-ту доби після початку експерименту. Метод ґрунтується на здатності клітин переводити резазурин, який має флуоресцентні властивості, в резорурфін з флуоресцентними властивостями. За кількістю резорурфіну в експериментальних зразках у порівнянні з контролем визначали кількість живих клітин на поверхні зразка.

2.2 Дослідження впливу хітозанових плівок на регенерацію механічного дефекту шкіри

Вивчення особливостей процесу регенерації шкірного покриву проведено на 180 білих лабораторних щурах – самцях 3 вікових груп – молоді (3 місяці), зрілі (9 місяців) та старечого віку (22 місяці).

Під час проведення досліджень усі тварини перебували в однакових умовах. У віварії підтримували сталу температуру, постійне освітлення; рівень шуму та інших сторонніх чинників не виходив за рамки встановлених норм. Утримування тварин та проведення експериментів відбувалися згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Гельсінською декларацією Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000).

Залежно від віку тварини були поділені на 6 серій, з яких 3 контрольні та 3 експериментальні (розподіл тварин поданий у таблиці 2.1).

Таблиця 2.1 – Розподіл тварин на серії

Серія тварин		Термін забору матеріалу після травми, днів				
		1	3	7	14	21
Контроль	молоді (КМ)	6	6	6	6	6
	зрілі (КЗ)	6	6	6	6	6
	старі (КС)	6	6	6	6	6
Експеримент	молоді (ЕМ)	6	6	6	6	6
	зрілі (ЕЗ)	6	6	6	6	6
	старі (ЕС)	6	6	6	6	6

Усім тваринам в умовах стерильної операційної було завдано стандартного дефекту – механічної травми шкіри з руйнуванням усіх шарів за власною методикою [227].

Для формування дозованої механічної травми шкіри з руйнуванням усіх шарів шкіри під дією внутрішньовенного кетамінового наркозу (10 мг на 1 кг маси тварини) лабораторну тварину голили на спині в міжлопатковій зоні, формуючи квадратну ділянку площею 9 см² (рис. 2.1). Тварину фіксували до предметного столика за чотири кінцівки. Додаткову фіксацію потрібної ділянки шкіри забезпечували шляхом опускання пластинки, що вільно ковзає по осі штатива (висота – 60 см), площею 20 см² (2x10 см) та масою 0,5 кг, в якій попередньо був сформований отвір діаметром 1,6 см. Далі, попередньо поголену шкіру обробляли 40 % розчином етилового спирту з метою профілактики бактеріальної контамінації.

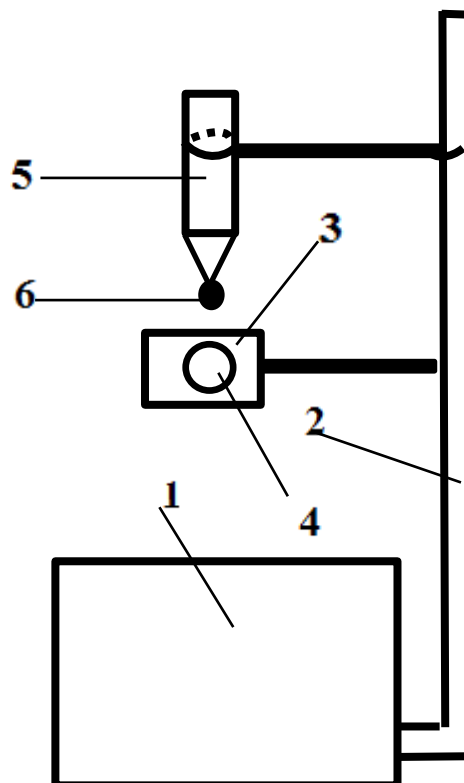


Рисунок 2.1 – Схема пристрою для моделювання механічної травми шкіри лабораторним тваринам: предметний столик 1 зі штативом 2, на який насаджується пластинка 3 додаткової фіксації з отвором 4 та бормашина 5 Proxxon-micromot 50E-28515 з алмазною пластинкою 6

Контактно впливаючи на шкіру жалом бормашини Proxxon-micromot 50E-28515, що закінчується алмазною пластинкою, площею 1,76 см² (діаметр 1,5 см) і товщиною 0,4 см, рукоятка якої зафіксована на штативі за допомогою тримача та ввімкнена в мережу постійного струму (220 В), за допомогою регулятора швидкості обертів вмикали потрібний режим швидкості обертів (5 000 обертів/хв), після запуску бормашини, тримач, що фіксує рукоятку бормашини, опускали та витримували на шкірі впродовж 2 секунд. У результаті даної експозиції створювали механічну рану всіх шарів шкіри до підшкірної клітковини з площею, що дорівнює площі алмазної пластинки.

Тварин виводили з наркозу та, підтримуючи стаціонарні умови, утримували в спеціально обладнаному віварії.

Контрольній групі тварин після завдання дефекту проводили стандартний туалет рани з використанням стерильних марлевих пов'язок, заміну яких проводили щоденно.

Експериментальній серії тварин для місцевого лікування рани з першої доби після травми використовували експериментальні хітозанові покриття, заміну яких проводили щоденно.

Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після завдання травми, що відповідає термінам, які характеризують основні етапи регенераційних процесів шкіри. Упродовж усього терміну проведення експерименту тварин щодня оглядали, відмічали їх загальний стан, активність, характер шкірного покриву, стан рани та прилеглих тканин.

Для вивчення морфофункціональних особливостей регенерації шкіри в умовах експерименту використовували такі методи дослідження:

1. Планіметричне дослідження ділянки травми

Після виведення тварин з експерименту травмовану ділянку фотографували за допомогою цифрового фотоапарата Nikon D3200 з одержанням зображень із роздільною здатністю 1920x1080. Для отримання реального зображення разом із поверхнею дефекту фотографували лінійку з мінімальною шкалою 1 мм. Після одержання та збереження зображення на жорсткому диску проводили вимірювання загальної площі дефекту, відсоток

некротизованих тканин, грануляцій та епітелізованих ділянок із використанням програми «SEO Image lab 2.0» (Суми, Україна).

З метою аналізу та оцінки стану ранової поверхні вивчали терміни очищення рани від гнійно-некротичних мас, швидкість появи грануляцій та початку крайової епітелізації, а також терміни повної епітелізації поверхні дефекту. Терміни загоєння ран визначаються швидкістю відновлення товщі дефекту, що характеризує зміни площі рани за одиницю часу. Показники швидкості загоєння дозволяють установити темпи репаративної регенерації в різні фази ранового процесу, що відображається на зменшення площі поверхні дефекту як у період заповнення рани грануляційною тканиною, так і за рахунок концентричного скорочення та рубцювання, а також за рахунок епітелізації поверхні.

2. Цитологічне дослідження поверхні дефекту

Для цитологічного дослідження проводили забір матеріалу з ранової поверхні за методом «мазків-відбитків», а також зіскоб – за методом «поверхневої біопсії» залежно від фази перебігу ранового процесу [228]. В кожному терміні дослідження виготовляли по 3–5 препаратів з однієї й тієї самої ділянки ранової поверхні після видалення кірочок і некротичних тканин із поверхні рани за допомогою марлевого тампона, змоченого у стерильному фізіологічному розчині. Отримані препарати висушували на повітрі та фіксували в метиловому спирті 5 хвилин або 15 хвилин – у суміші Нікіфорова та фарбували за Романовським – Гімзою й гематоксилін-еозином. Готові препарати досліджували з метою встановлення характеру цитогам за допомогою імерсійної системи (збільшення 7–10x90). Проводили вивчення цитограми за такими показниками: кількістю лейкоцитів у полі зору, клітинного складу у відсотках: лейкоцитів (нейтрофіли, лімфоцити, моноцити, еозинофіли), гістіоцитів (макрофаги, полібласти) та клітин сполучної тканини (фібробласти), а також ендотеліоцитів та епітеліоцитів. Під час цитологічного дослідження мазків враховували також кількісний та якісний склад мікрофлори, характер фагоцитозу, наявність та кількісний склад лейкоцитів з ознаками дегенерації.

3. Гістологічне дослідження.

З метою виготовлення гістологічних препаратів проводили біопсію ранової поверхні з прилеглою шкірою та підлеглими тканинами розміром 2 см² і товщиною до 5 мм. Біопсію ранової поверхні проводили в її центральних та периферичних відділах (5 шматочків із кожної рани). Для виготовлення гістологічних препаратів шматочки біопсії фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (рН 7,2) впродовж 1 доби, потім зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафінові блоки. Потім виготовлялися серійні зрізи товщиною 5–7 мкм, які після депарафінізації забарвлювали гематоксилін-еозином. Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа «Olympus BH 2» з цифровою відеокамерою DCM 510 5,0 pixels та зберігали фотографії на жорсткому диску з подальшим друком кольорових зображень.

Оцінку процесу віновлення товщі механічних дефектів шкіри проводили з урахуванням комплексу морфологічних показників, що характеризують регенераторний процес: характером пошкодження епідермісу та дерми; наявністю та ступенем інтенсивності процесу запалення, особливостями розладів кровообігу; термінами й особливостями очищення рани; наявністю та якісним складом клітинного інфільтрату; ступенем зрілості грануляційної тканини за співвідношенням клітинних та волокнистих елементів; ступенем відторгнення струпу регенеруючої поверхні шкіри; термінами розвитку сполучнотканинного й епітеліального регенератів та рівнем їх диференціювання й поширення; особливістю синхронності регенераторних процесів у системі епітелій-сполучна тканина; характером процесу ангіонеогенезу; наявністю або відсутністю морфологічних проявів патологічної регенерації епітелію та сполучної тканини (гіперплазія, рубцювання).

4. Морфометрія гістологічних препаратів.

Морфометричне дослідження проводили за допомогою програми «SEO Imagelab 2.0» (Суми, Україна) з урахуванням наступних показників: відносна площа стромального набряку, відносна площа судин дерми, середній діаметр

судин дерми в мкм, відносна площа судин грануляційної тканини та середній діаметр судин грануляційної тканини в мкм [228].

5. Мікробіологічне дослідження поверхні травми

Виходячи з того, що для механічних ран характерне зараження не монокультурою, а в основному асоціаціями мікроорганізмів, для мікробіологічного дослідження мікрофлори механічної рани використовували змиви, які засівали на різні спеціальні живильні середовища (кров'яний агар, жовтково-сольовий агар, середовище Ендо, агар Цейслера, живильне середовище «Псевдомонас АПС-20» та середовище Сабуро) з метою виділення й ідентифікації виділених мікроорганізмів.

Мікробіологічне дослідження механічної рани щурів здійснювали до початку нанесення хітозанового гелю та після його нанесення з 1-ї доби, для цього використовували бактеріоскопічний (фарбування за методом Грама з подальшою імерсійною мікроскопією) та бактеріологічний методи.

Виділення та ідентифікацію аеробних мікроорганізмів здійснювали на живильних середовищах під час культивування в термостаті за оптимальних температурних режимів.

6. Статистичні методи

Статистичну обробку цифрових даних проводили за допомогою програми SPSS Statistica 21.0. Нормальність розподілу перевіряли за допомогою одновибіркового критерію Колмогорова – Смирнова. Порівнювали середні величини, використовуючи t-критерій для незалежних вибірок. Достовірною вважали різницю при $t \leq 0,05$.

Матеріали розділу опубліковано у працях [227, 229, 230].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових плівок

Згідно з даними літератури властивості та будова матеріалів із хітозану залежать від таких параметрів, як молекулярна маса, ступінь деацетилювання та походження самого хітозану [231]. В нашому експерименті ми використовували хітозан зі ступенем деацетилювання 83 % та молекулярною масою 200, 500 та 700 кДа. Для вибору оптимального матеріалу ми провели вивчення будови плівки, її деградацію в модельному розчині та експеримент із визначенням цитотоксичності.

Результати проведеної інфрачервоної спектроскопії свідчать про типову структуру, характерну для хітозану. При цьому хітозан із молекулярною масою 200 та 500 кДа має подібні спектри (gel A), в той час як матеріал із хітозану з молекулярною масою 500 кДа (gel B) має деякі відмінності. У спектрах gel A і gel B наявні смуги, асоційовані з валентними ($3\ 100 - 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$) і деформаційними ($2\ 200 - 2\ 100\ \text{cm}^{-1}$) коливаннями іона NH_3^+ та коливаннями іонізованої карбоксильної групи ($1\ 650$ і $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$). Смуга $1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ у спектрі gel B відповідає деформаційним коливанням С-ОН оцтової кислоти (рис. 3.1).

Растрова електронна мікроскопія поверхні матеріалу показала, що плівки мають складну топографію, і їх будова залежить від молекулярної маси хітозану. Так, зростання молекулярної маси приводить до утворення більш рівної поверхні порівняно з низько- та середньомолекулярним хітозаном. Відомо, що наявність рельєфу, особливо у нано- та мікродіапазоні, є сприятливим чинником для адгезії клітин [232].

Так, багатьма авторами доведено, що формування мікрорельєфу на поверхні дентальних та ортопедичних імплантатів підвищує адгезію протеїнів плазми крові та ріст клітин у культурі [233]. *In vivo* дослідження та клінічні

дані свідчать про зростання індексу остеоінтеграції при використанні подібних імплантатів [234]. Використання хітозанових скафолдів для тканинної інженерії шкіри також потребує наявності пористості та рельєфності зразків.

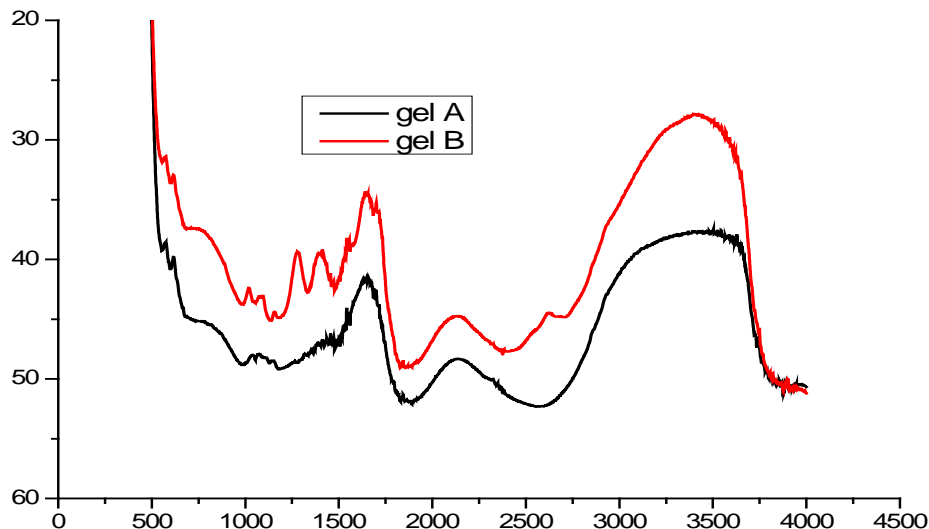


Рисунок 3.1 – Інфрачервоні спектри гелів на основі солей хітозану з різною молекулярною масою

Вивчення будови профілю мембран засвідчило, що пористість мембран зростає у матеріалах, синтезованих із хітозану масою 500 кДа порівняно з плівками з низькомолекулярного хітозану (рис. 3.2). Проте синтез плівок із хітозану з молекулярною масою 700 кДа приводить до формування щільної мембрани, в якій відсутні пори. Наявність пористості має значення для таких властивостей, як паропровідність та сорбційна здатність [235]. Зростання пористості, за даними більшості авторів, сприяє істотному зростанню сорбції рідин, зокрема фізіологічного розчину, SBF, DMEM в експериментах *in vitro*, а також ранового ексудату в клінічних дослідженнях [236].

Таким чином, оптимальними з точки зору будови є плівки, синтезовані з хітозану з молекулярною масою 200 та 500 кДа.

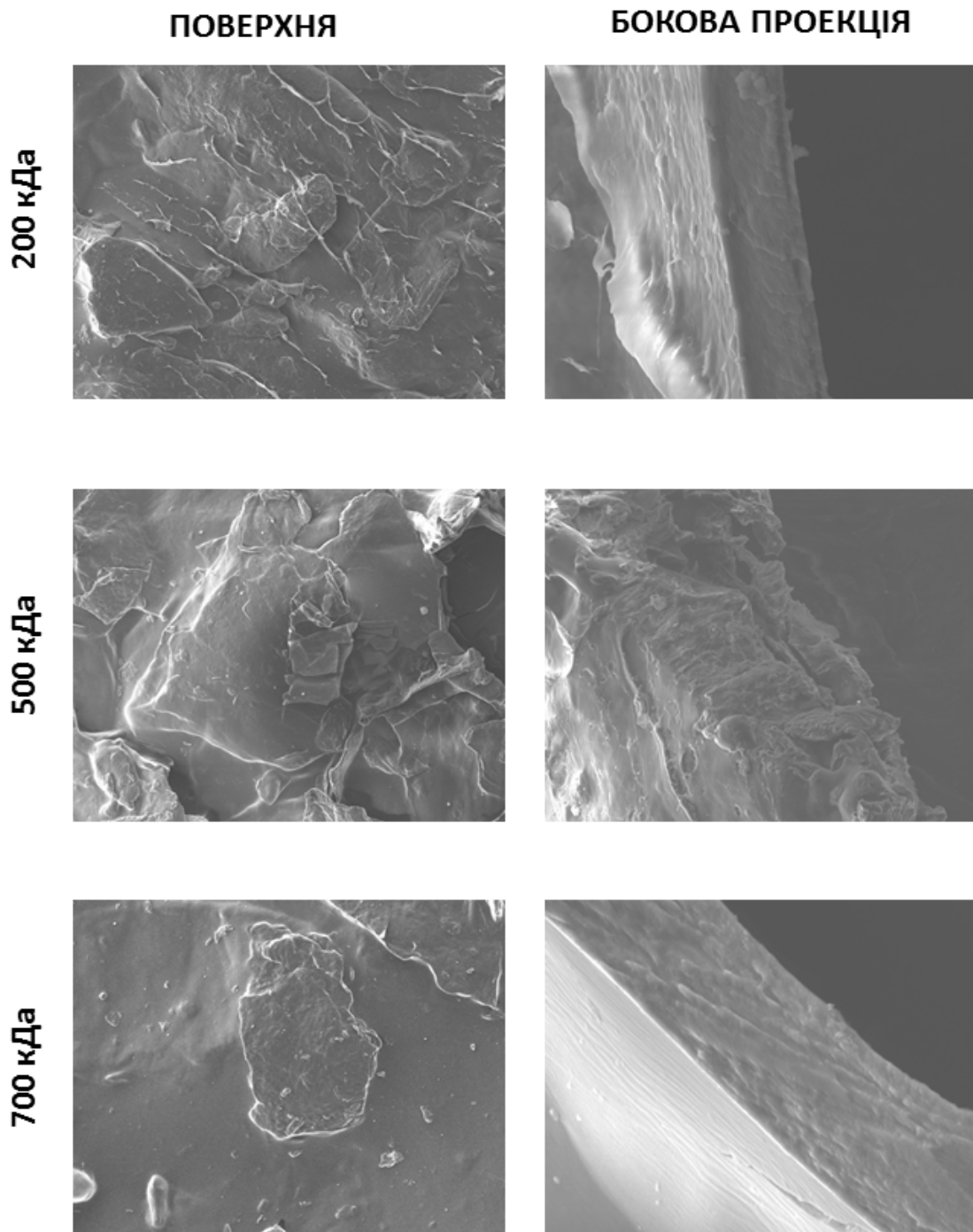


Рисунок 3.2 – Растрова мікроскопія поверхні та бокової проекції плівок із хітозану з різною молекулярною масою. Зб. x500–2 000

Визначення здатності до деградації показало наявність вираженої залежності від молекулярної маси зразків хітозану. Деградацію плівок

проводили в розчині SBF, що за рН та іонним складом є найбільш подібним до плазми крові та інтерстиціальної рідини [237]. При цьому необхідно враховувати, що можлива як гідролітична, так і ферментативна деградація матеріалів із хітозану [238]. Специфічним ферментом, що каталізує розщеплення хітину та хітозану, є хітиназа, яка відсутня в організмі людини [239]. Проте неспецифічну дію можуть виявляти також деякі протеолітичні ферменти. Важливе значення має також рН розчину, оскільки відомо, що розчинення хітозану можливе лише в кислому середовищі [240]. Оскільки рН рани може зміщуватися в кислий бік, то за клінічних умов деградація хітозанових плівок буде відбуватися з більшою швидкістю.

Ранні результати експерименту з деградацією показали нульову втрату маси зразків через 15 хвилин після їх занурення у розчин (рис. 3.3). При цьому матеріали з молекулярною масою 700 кДа не втрачають ваги і через 30 і 40 хвилин. Лише через 1 годину спостерігається незначна втрата ваги – до $(3,8 \pm 0,45)$ %. Зразки з масою 200 та 500 кДа втрачають від $(4,2 \pm 0,3)$ до $(5,4 \pm 0,6)$ % через 300 хвилин контакту із SBF. Через 1 годину експерименту зменшення маси зразків досягає $(5,4 \pm 0,9)$ та $(6,7 \pm 0,5)$ %.

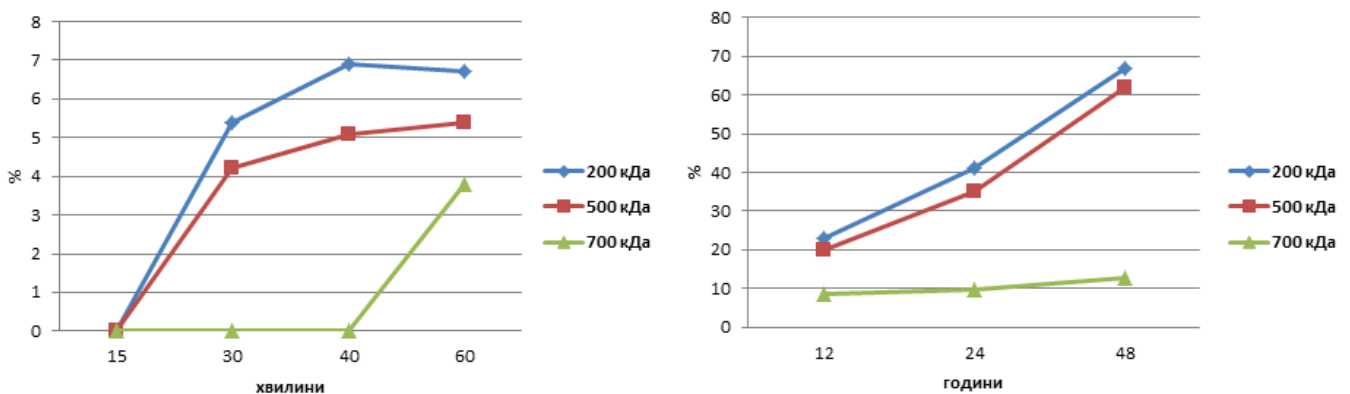


Рисунок 3.3 – Відсоток втрати маси зразків із хітозану з різною молекулярною масою в різні терміни після занурення в розчин SBF

Деградація зразків терміном від 12 до 48 годин довела незначну втрату маси плівок із високомолекулярного хітозану на відміну від матеріалу з молекулярною масою 200 та 500 кДа. Відсоток втрати маси плівками з масою

700 кДа становить від $(8,6 \pm 1,3)$ до $(12,8 \pm 1,9)$ %. Зразки з низько- та середньомолекулярного хітозану втрачають близько чверті маси через 12 годин та до $(41 \pm 5,7)$ і $(67 \pm 6,9)$ % – через 24 та 48 годин. Зважаючи на те, що в основі механізму дії матеріалів із хітозану є вплив мономерів, утворених у процесі деградації, на клітини органа-мішені [241], плівки з високомолекулярного хітозану є неприйнятними для клінічного використання з метою лікування дефектів шкіри.

Дослідження плівок із використанням культури клітин (фібробластів) дає можливість оцінити як цитотоксичність зразків, так і можливу стимуляцію клітинних популяцій з наявністю продуктів деградації хітозану. Таким чином, цей експеримент має на меті селекцію оптимальних зразків для подальшого дослідження на тваринних моделях.

Мікроскопічне дослідження поверхні плівок із культурою фібробластів показало їх задовільну адгезію на поверхні зразків через 3 дні культивування (рис. 3.4). При цьому необхідно відзначити, що будова клітин на поверхні плівок із хітозану 200 з молекулярною масою кДа місцями має деструктивний характер – клітини набувають округлої та овальної форм, що характерно для їх пошкодження. На поверхні плівок із молекулярною масою 500 кДа клітини мають чисельні інвагінації та відростки, і лише на поверхні високомолекулярного хітозану фібробласти мають типову веретеноподібну будову.

Через 7 днів культивування простежується формування моношару клітин на поверхні середньо- та високомолекулярного хітозану, в той час як на поверхні матеріалу з хітозану з молекулярною масою 200 кДа спостерігається значна частка загиблених клітин. Через 14 днів відбувається формування щільного моношару фібробластів на поверхні плівок із хітозану з молекулярною масою 500 та 700 кДа, і майже повністю відсутні клітини нормального фенотипу на поверхні зразків із хітозану 200 кДа.

Використання реакції редукції резазурину дозволило розрахувати відносні величини активності клітин у різні терміни спостереження та підтвердити дані мікроскопічного дослідження.

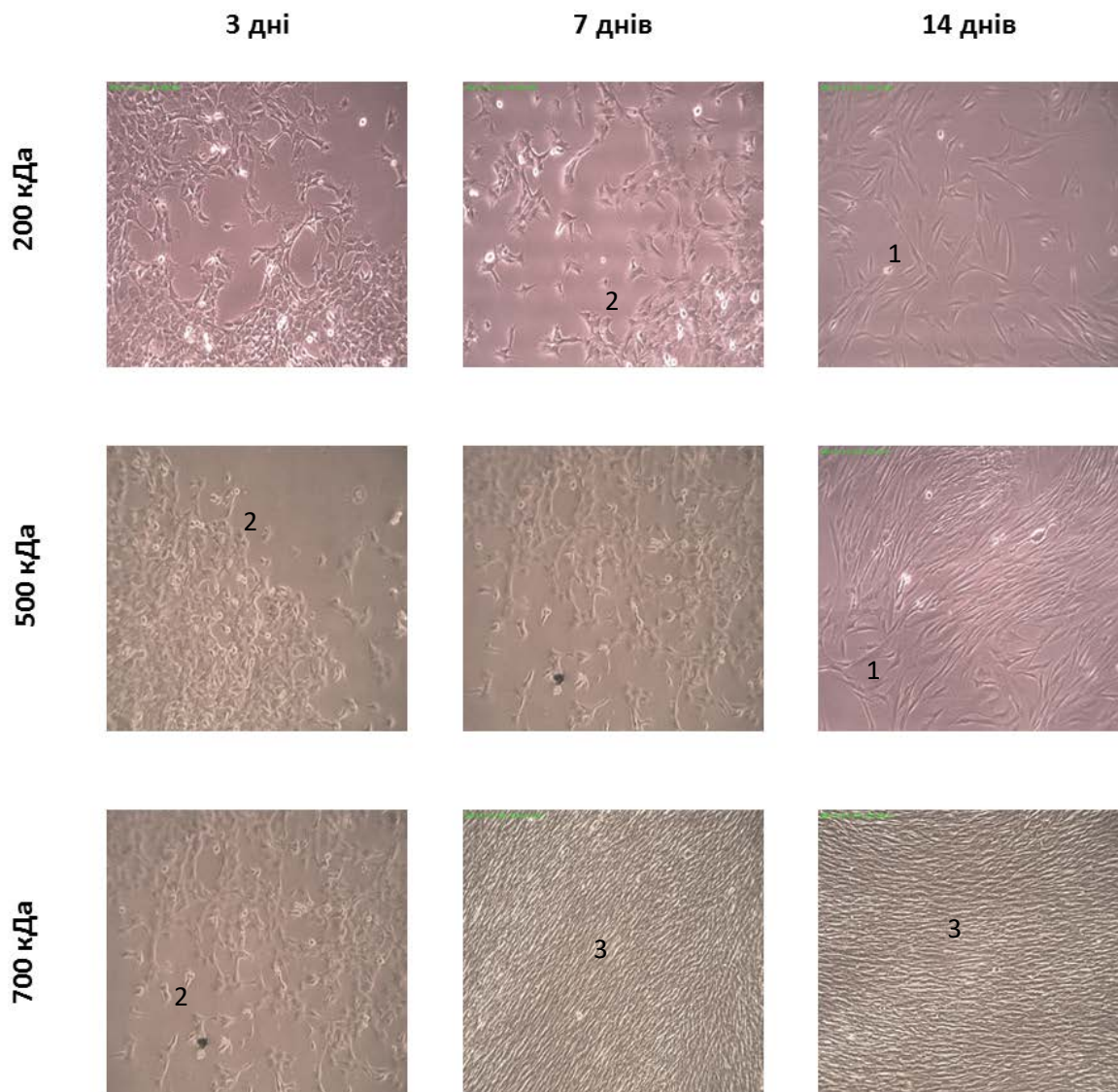


Рисунок 3.4 – Культура клітин фібробластів (OF) на поверхні хітозанових плівок із різною молекулярною масою через 3, 7 та 14 днів від початку культивування. Зб. x 100. 1 – фібробласт типової форми; 2 – патологічно-змінена клітина; 3 – моношар фібробластів

Як бачимо (рис. 3.5), ріст клітин на культуральному пластику відбувається повільно з 3-го до 14-го дня спостереження. Рівень флюоресценції в останній термін спостереження досягає (793 ± 67) Од. Цікавим є той факт, що активність клітин на поверхні матеріалу з низькомолекулярного хітозану є достовірно меншою порівняно з культуральним контролем, що свідчить про наявність цитотоксичної дії продуктів деградації. На відміну від цього метаболічна активність

фібробластів на поверхні матеріалу із середньомолекулярного хітозану є достовірно більшою, а рівень флюоресценції резаурину в середовищі з високомолекулярним хітозаном майже вдвічі перевищує позитивний контроль.

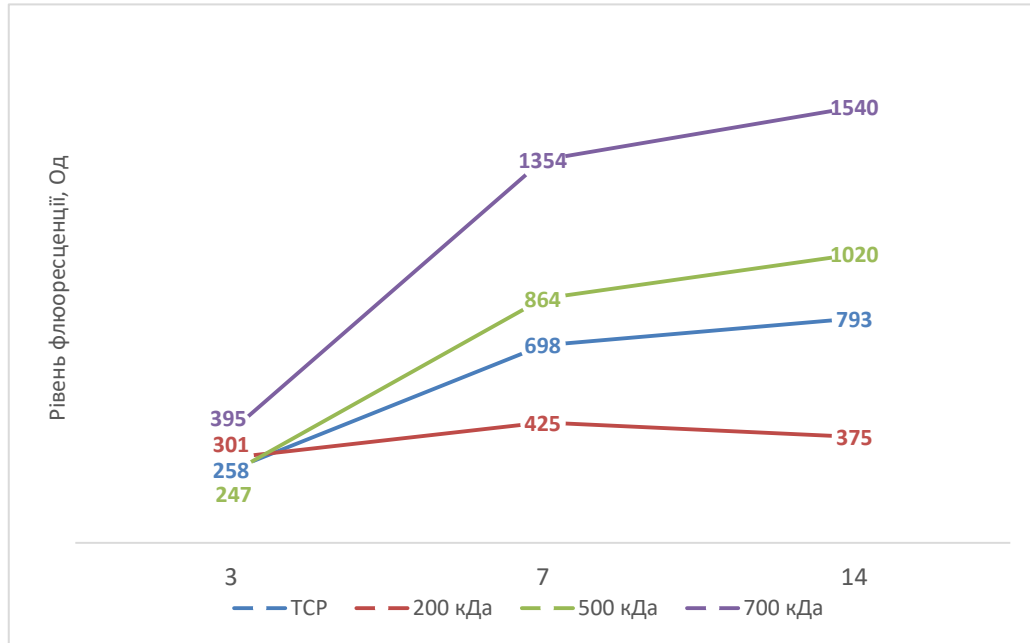


Рисунок 3.5 – Метаболічна активність клітин за флюоресценцією резаурину (Alamar Blue assay) в різні терміни після культивування на поверхні мембран із різною молекулярною масою. TCP – культуральний пластик

Таким чином, незважаючи на задовільні сорбційні властивості, плівки з молекулярною масою 200 кДа показали цитотоксичну дію та не можуть бути використані в експерименті на тваринах. Одним із механізмів токсичної дії може бути проникнення низькомолекулярних продуктів деградації в середину клітини та зв'язування з ДНК, що блокує синтез білка. Цей механізм описаний як один із можливих антибактеріальних для низькомолекулярного хітозану, проте, ймовірно, він може впливати також на еукаріотичні клітини [242]. Незважаючи на відсутність цитотоксичності та наявність стимуляції проліферації фібробластів, плівки з молекулярною масою 700 кДа також сумнівно можуть бути використані для лікування пошкоджень шкіри через відсутність пористості та низький потенціал деградації.

Таким чином, після вивчення фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності плівок із хітозаном з різною молекулярною масою, оптимальним варіантом для застосування в експерименті на тваринах є матеріали з хітозану з молекулярною масою 500 кДа.

3.2 Особливості планіметричних показників ділянки шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії

Загальна площа рани у тварин усіх вікових груп контрольної серії на першу добу становила від $(1,75 \pm 0,28)$ до $(1,76 \pm 0,26)$ см². Початок процесу регенерації (3-тя доба) приводить до незначного зменшення площі дефекту у тварин усіх вікових груп, проте найбільші зміни спостерігаються у тварин молодого віку. При цьому загальна площа рани становила $(1,65 \pm 0,31)$ см², що на 5,71 % ($p = 0,81$) менше, ніж у попередній термін.

Через 7 днів спостереження у тварин молодого віку площа дефекту становила $(1,28 \pm 0,15)$ см², що на 26,85 % ($p = 0,16$) менше, ніж у день завдання, що свідчить про активацію процесів регенерації. У щурів зрілого віку площа дефекту становила при цьому $(1,36 \pm 0,21)$ см² та у щурів старечого віку – $(1,44 \pm 0,29)$ см². Таким чином, ми спостерігаємо більш виражену активацію репарації шкіри у тварин молодого та зрілого віку.

Через 14 днів після травми площа дефекту у тварин молодого віку зменшилася більше ніж утричі й становила $(0,57 \pm 0,06)$ см². При цьому у тварин зрілого та старечого віку даний показник становив $(0,8 \pm 0,14)$ та $(1,0 \pm 0,12)$ см² відповідно, що свідчить про уповільнення процесів регенерації з віком.

В останній термін спостереження відбувається повне загоєння механічного дефекту у тварин молодого віку. У щурів зрілого і старечого віку загальна площа дефекту становила $(0,16 \pm 0,04)$ та $(0,23 \pm 0,06)$ см² відповідно, незважаючи на майже повну епітелізацію рани (рис. 3.6).

Аналізуючи дані планіметрії щодо відносної площі тканин рани, встановлено, що некротично змінені тканини займають відносну площу від $(21,28 \pm 1,39)$ % у щурів молодого віку до $(21,41 \pm 0,91)$ % у тварин старечого віку в перший день після травми. На початкових стадіях репарації шкіри відбувається очищення рани від некротично змінених тканин клітинами макрофагального ряду, що мігрують у вогнище дефекту [243]. Через 3 доби після моделювання механічної травми не спостерігається достовірних змін

площі некрозу у тварин зрілого та старечого віку, яка становить відповідно $(20,01 \pm 0,87)$ та $(20,39 \pm 1,13)$ %. Лише у тварин молодого віку відзначається незначне, проте достовірне зменшення площі некрозу до $(19,2 \pm 1,14)$ % ($p = 0,27$).

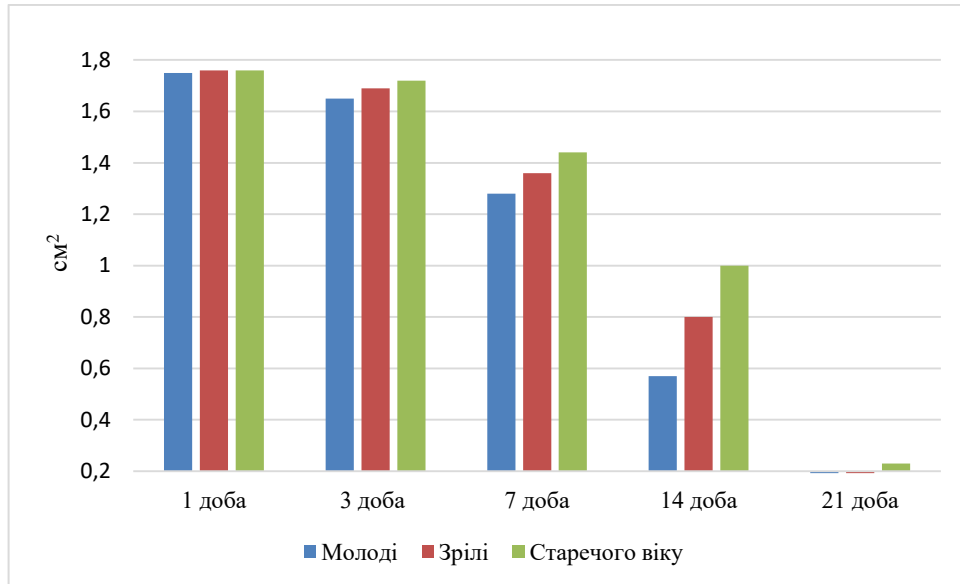


Рисунок 3.6 – Динаміка зміни площі дефекту шкіри контрольної серії тварин різних вікових груп

До 7-ї доби після травми відбувається значне зменшення площі некротичних тканин у тварин усіх вікових груп. У даний термін площа некрозу становить відповідно до віку $(6,19 \pm 0,49)$, $(7,21 \pm 0,21)$ та $(7,89 \pm 0,54)$ %. У тварин молодого віку відбувається більш швидке очищення рани порівняно з іншими віковими групами (рис. 3.7). За даними літератури механічна травма завдає меншого пошкодження тканинам порівняно з опіковою чи хімічною раною, тому до 14-ї доби спостереження відбувається повне очищення поверхні дефекту від некротично змінених тканин, що сприяє швидкій епітелізації поверхні [244].

Грануляційна тканина є першою, яка заповнює місце дефекту шкіри. Перші грануляції з'являються вже через 3 доби після завдання травми, при цьому їх площа становить від $(8,56 \pm 0,65)$ % у тварин старечого віку до $(10,12 \pm 0,61)$ % у щурів молодого віку. До 7-ї доби відбувається активний ріст грануляцій, що виповнюють значну частину поверхні рани. Ми не

спостерігаємо достовірної різниці площі грануляційної тканини у тварин різних вікових груп, відносна площа якої становить від $(31,03 \pm 1,24)$ до $(33,72 \pm 1,04)$ %. У подальшому відбуваються трансформація грануляційної тканини та формування сполучнотканинної основи шкіри. До 14-ї доби у тварин молодого віку кількість грануляційної тканини зменшується вдвічі і становить $(16,15 \pm 0,49)$ %. У тварин зрілого та старечого віку ми спостерігаємо уповільнення трансформації грануляцій, площа яких становить відповідно $(20,27 \pm 1,13)$ та $(21,34 \pm 0,85)$ % на 14-й день спостереження. До 21-ї доби після травми на поверхні дефекту не візуалізується грануляційна тканина у щурів усіх вікових груп (рис. 3.7).

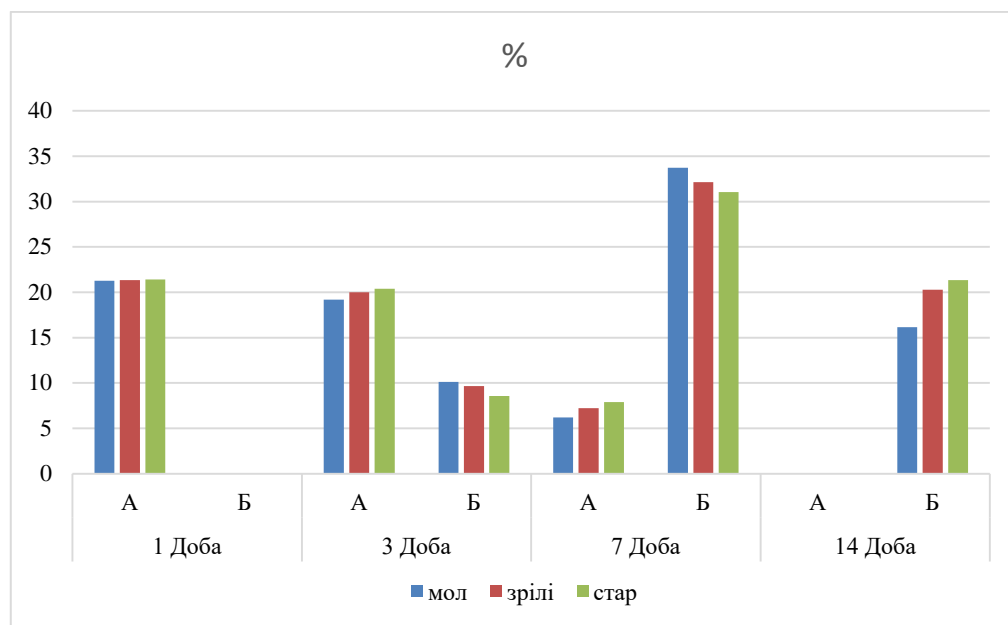


Рисунок 3.7 – Динаміка зміни відносної площі некрозу (А) та грануляційної тканини (В) на поверхні дефекту шкіри контрольної серії тварин різних вікових груп

Епітелізація дефекту є кінцевим етапом регенерації травми шкіри. Початок процесів епітелізації ми спостерігаємо із 7-ї доби після завдання травми. Відносна площа епітелізації при цьому є незначною та коливається від $(2,98 \pm 0,33)$ % у щурів старечого віку до $(7,12 \pm 0,49)$ % у тварин молодого віку. До 14-ї доби на фоні зменшення кількості грануляцій відбувається збільшення площі епітелізації рани. При цьому відсоток закриття дефекту

різниться залежно від віку. Найменший відсоток площі епітелізації спостерігається у тварин старечого віку – $(35,16 \pm 0,98) \%$, дещо більша площа у тварин зрілого віку – $(40,48 \pm 1,03) \%$ та найбільш значна у тварин молодого віку – $(47,82 \pm 1,24) \%$. Інтенсивність епітелізації зберігається до 21-ї доби відповідно, і її відносна площа становить $(76,34 \pm 2,14) \%$ у тварин старечого віку, $(87,16 \pm 2,76) \%$ – зрілого та $(98,71 \pm 1,12) \%$ – молодого віку (рис. 3.8). Таким чином, ми спостерігаємо майже повну епітелізацію у тварин молодого та зрілого віку та її затримку – у тварин старечого віку.

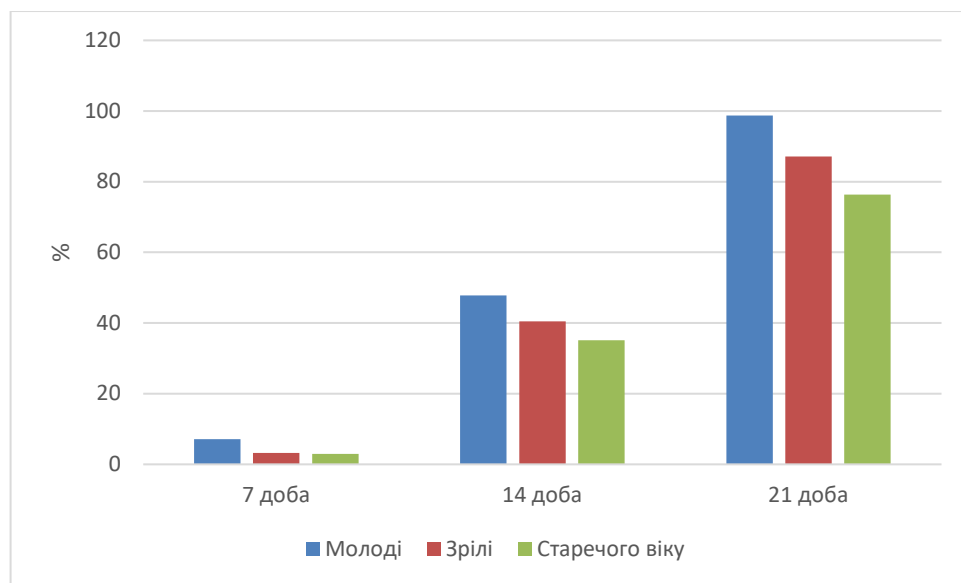


Рисунок 3.8 – Динаміка зміни відносної площі епітелізованих ділянок поверхні дефекту шкіри контрольної серії тварин різних вікових груп

При використанні хітозанових мембран для лікування механічної травми через 1 добу не спостерігається достовірної різниці загальної площі дефекту у тварин усіх вікових груп. Проте вже через 3 доби після травми у тварин молодого віку загальна площа дефекту зменшується на $8,48 \%$ ($p = 0,7$) і становить $(1,51 \pm 0,19) \text{ см}^2$. Через 7 днів спостерігається подальша активація процесів загоєння дефекту, що супроводжується зменшенням загальної площі рани до $(1,00 \pm 0,16) \text{ см}^2$ ($p = 0,24$) та до $(0,35 \pm 0,05) \text{ см}^2$ ($p = 0,01$) – на 14-ту добу. На 21-шу добу спостерігається, як і в контрольній групі тварин, відповідно повне загоєння рани. У тварин зрілого віку вже на 3-тю добу

загальна площа дефекту становить $(1,62 \pm 0,17)$ см², що на 4,14 % ($p = 0,83$) менше, ніж у контрольній групі в аналогічні терміни. Загальна площа дефекту на 7-му добу спостереження становить $(1,12 \pm 0,12)$ см², що на 17,64 % ($p = 0,34$) менше порівняно з показниками контрольної групи та свідчить про подальшу активацію процесів загоєння рани – це підтверджується зменшенням загальної площі рани до $(0,64 \pm 0,04)$ см², що на 20,0 % ($p = 0,29$) менше порівняно з контрольною групою на 14-ту добу після завдання дефекту. На 21-шу добу в експериментальній групі тварин ми спостерігаємо повне загоєння рани, в той час як у контрольній групі площа дефекту становить $(0,16 \pm 0,04)$ см².

Аналізуючи ефективність застосування хітозанових мембран для лікування дефектів шкіри у тварин старечого віку, необхідно зазначити, що достовірна різниця відносно загальної площі дефекту відмічається лише із 7-ї доби спостереження. Площа дефекту становить $(1,24 \pm 0,29)$ см², що на 13,88 % ($p = 0,63$) менше порівняно з контрольною групою. На 14-ту добу після травми площа дефекту становить $(0,84 \pm 0,11)$ см², що на 16,0 % ($p = 0,34$) менше, порівнюючи з контролем. На 21-шу добу спостереження на відміну від контрольної групи, де площа дефекту становить $(0,23 \pm 0,06)$ см², у щурів експериментальної групи спостерігається повне загоєння рани (рис. 3.9).

Використання хітозанових мембран у тварин молодого віку приводить до стрімкого зменшення площі некрозу вже через 3 доби після травми до $(16,13 \pm 1,14)$ % ($p = 0,08$), що свідчить про швидке очищення рани макрофагами. Ця тенденція спостерігається до 7-ї доби, при цьому площа некрозу зменшується на 40,06 % ($p = 0,0007$) порівняно з контрольною групою і становить лише $(3,71 \pm 0,17)$ %.

Як і в контрольній групі тварин, на 14-ту та 21-шу доби ми не спостерігаємо наявності некротичних мас у дефекті. Відносна площа некрозу у тварин зрілого віку експериментальної серії на 3-тю добу становить $(18,97 \pm 1,09)$ %, що свідчить про пришвидшення процесів очищення поверхні рани, можливо, за рахунок міграції макрофагів у ділянку дефекту. Вже на 7-му добу після завдання травми площа некрозу становить $(4,04 \pm 0,29)$ %, що на 43,96 %

($p = 0,0001$) менше, ніж у контрольній групі тварин. Це свідчить про високу ефективність застосування хітозанових мембран для лікування дефектів шкіри. На 14-ту та 21-шу добу, як і в контрольній групі тварин, ми не спостерігаємо некротичних мас.

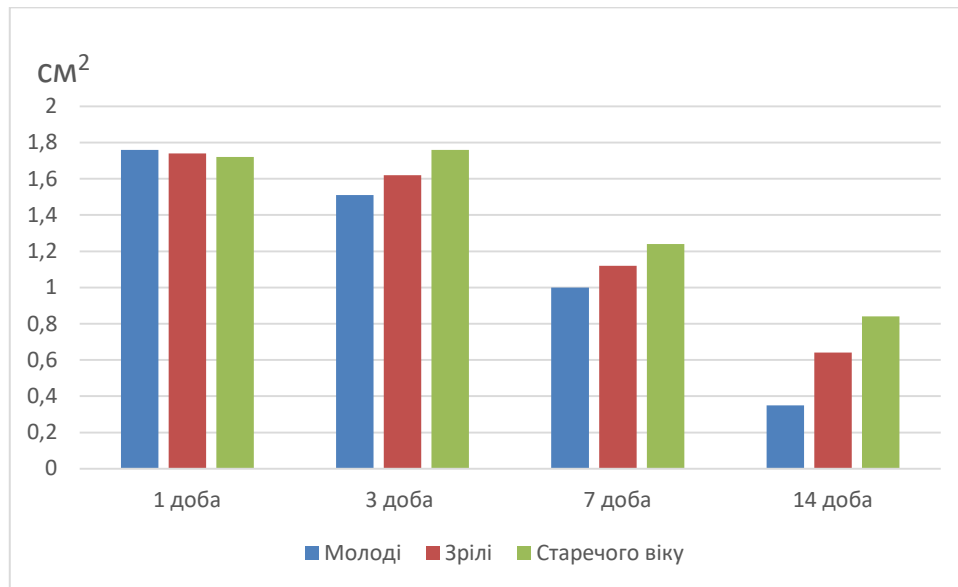


Рисунок 3.9 – Динаміка зміни площі дефекту шкіри експериментальних тварин різних вікових груп

У щурів старечого віку за умов застосування хітозану відзначається більш раннє зменшення відносної площі некрозу порівняно з контрольною групою тварин. Так, уже на 3-тю добу спостереження різниця становить 6,32 % ($p = 0,38$). Ця тенденція продовжується до 7-ї доби, при цьому відносна площа некрозу зменшується на 46,51 % ($p \leq 0,0001$) і становить лише $(4,22 \pm 0,11)$ %. На 14-ту та 21-шу доби спостереження на поверхні дефекту некротичні маси не відрізняються (рис. 3.10).

Через 3 доби після травми у тварин молодого віку за умов використання хітозанових плівок відбувається активація росту грануляцій у дефекті. Відносна площа грануляційної тканини збільшується на 30,53 % ($p = 0,0023$), що становить $(13,21 \pm 0,46)$ % від загальної площі рани. Через 7 днів після травми кількість грануляційної тканини порівняно з контрольною групою зменшується на 12,06 % ($p = 0,04$), що свідчить про більш ранній початок

трансформації грануляційної тканини в сполучнотканинну основу шкіри. Це підтверджують дані про зменшення кількості грануляцій на 14-ту добу на 20,68 % ($p \leq 0.0001$), що становить лише $(12,81 \pm 0,17)$ % від загальної площі дефекту.

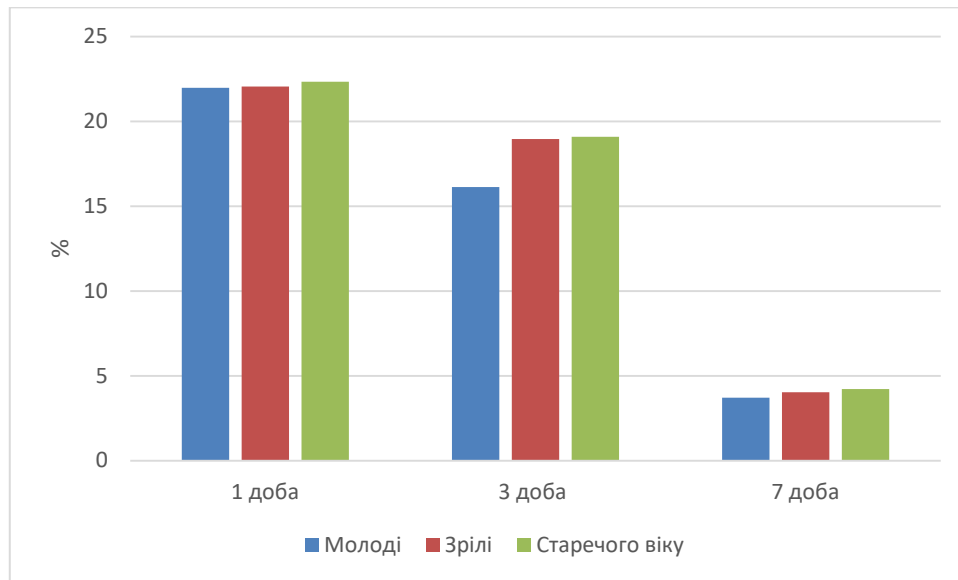


Рисунок 3.10 – Динаміка зміни відносної площі некрозу на поверхні дефекту шкіри експериментальних тварин різних вікових груп

У тварин зрілого віку відносна площа епітелізації на 3-тю добу спостереження збільшується на 29,22 % ($p = 0,01$) порівняно з контрольною групою тварин і становить $(12,47 \pm 0,53)$ % від загальної площі рани. Відносна площа грануляційної тканини на 7-му добу зменшується порівняно з показниками контрольної групи на 11,23 % ($p = 0,0027$) і становить $(28,51 \pm 0,62)$ %. На 14-ту добу кількість грануляцій становить $(15,27 \pm 0,29)$ %, що на 24,66 % ($p = 0,0016$) менше порівняно з контрольною групою тварин. На 21-шу добу після завдання дефекту ми не спостерігаємо грануляцій в рані експериментальної та контрольної груп тварин.

У тварин старечого віку відсоток грануляційної тканини через 3 дні після травми зростає на 40,42 % ($p = 0,0031$) і становить при цьому $(12,02 \pm 0,61)$ % від загальної площі рани. На 7-му добу спостереження її відносна площа порівняно з показниками контрольної групи зменшується на 10,18 % ($p =$

0,0564), що є результатом більш ранньої трансформації грануляцій у сполучнотканинну основу шкіри (рис. 3.11). Це підтверджується й на 14-ту добу – відносна площа грануляцій становить $(17,36 \pm 0,31) \%$, а порівняно з контрольною групою різниця становить 18,65 % ($p = 0,0013$).

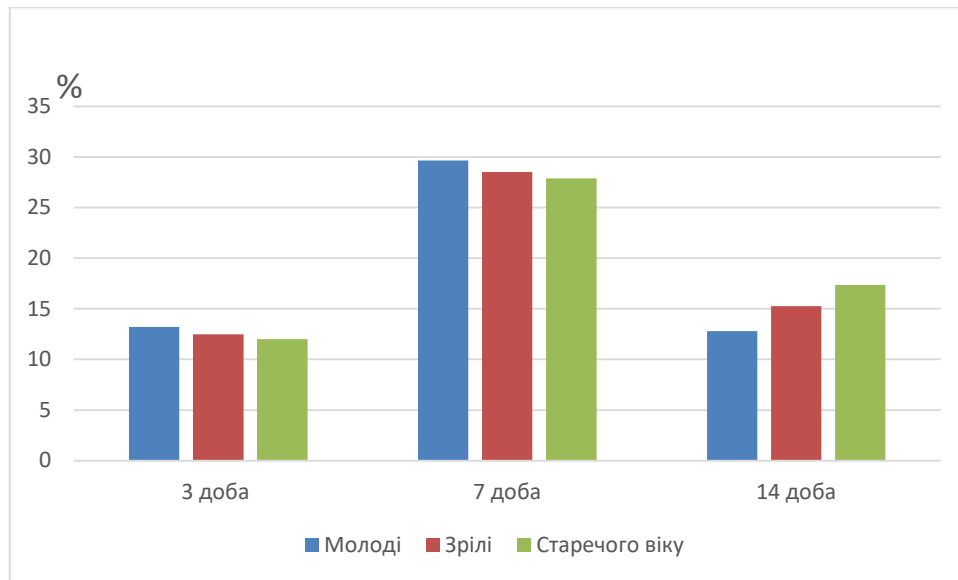


Рисунок 3.11 – Динаміка зміни відносної площі грануляційної тканини на поверхні дефекту шкіри експериментальних тварин різних вікових груп

У тварин молодого віку за умов застосування хітозану відбувається більш ранній початок епітелізації поверхні рани. Так, уже на 7-му добу після травми відносна площа епітелізації становить $(12,21 \pm 0,17) \%$, що на 71,48 % ($p \leq 0,0001$) перевищує контроль. На 14-ту добу відсоток епітелізації становить $(68,11 \pm 1,07) \%$, а в останній термін спостереження – $(98,37 \pm 0,71) \%$. За умов застосування хітозанових мембран у тварин зрілого віку також відбувається більш ранній початок епітелізації поверхні ранового дефекту. Вже на 7-му добу відсоток відносної площі епітелізації вдвічі перевищує контрольний показник і становить $(6,48 \pm 0,11) \%$ ($p \leq 0,0001$). На 14-ту та 21-шу доби спостереження відносна площа епітелізації рани становить $(56,10 \pm 0,54) \%$ ($p \leq 0,0001$) та $(91,44 \pm 1,32) \%$ ($p = 0,1921$) відповідно.

У тварин старечого віку, як і в тварин інших вікових груп, за умов застосування хітозану відбувається більш рання епітелізація поверхні рани

(рис. 3.12). Так, уже на 7-му добу спостереження відносна площа епітелізації становить $(3,95 \pm 0,19) \%$, що на $32,55 \%$ ($p = 0,029$) перевищує показники контрольної групи. На 14-ту та 21-шу доби відсоток епітелізації становить $(45,91 \pm 1,93) \%$ ($p = 0,0006$) та $(88,62 \pm 1,71) \%$ ($p = 0,0012$) відповідно.

Отже, проаналізувавши показники планіметричного дослідження поверхні рани тварин різного віку контрольної та експериментальної серій, можемо відзначити уповільнення процесів очищення рани та її епітелізації з віком, а також більш швидке очищення від некротичних мас та повну і ранню епітелізації поверхні рани при застосуванні хітозанових мембран із метою лікування дефектів шкіри механічної етіології.

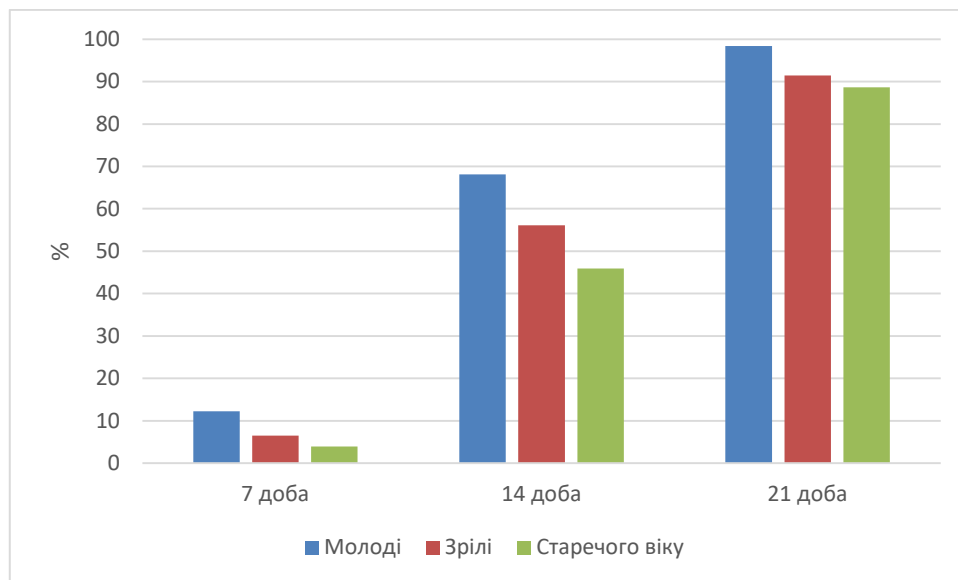


Рисунок 3.12 – Динаміка зміни відносної площі епітелізованих ділянок на поверхні дефекту шкіри експериментальних тварин різних вікових груп

Таким чином, у тварин контрольної серії площа дефекту зменшується до 21-ї доби спостереження одночасно зі зростанням відсотка епітелізованих ділянок та зменшенням площі некрозу. При цьому відзначається виражена вікова залежність – уповільненням процесів загоєння рани у щурів старечого віку. Використання хітозанових мембран приводить до прискорення очищення рани від некротичних мас, більш ранньої появи грануляцій та

зростання їх площі. У тварин старечого віку використаний матеріал не приводить до достовірного зрушення більшості планіметричних показників.

3.3 Особливості показників цитології ділянки травми шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії

Після завдання механічної травми шкіри тваринам різних вікових груп цитологічна картина поверхні рани на першу добу свідчить про міграцію в зону ушкодження формених елементів крові, серед яких переважають лейкоцити (рис. 3.13). Кількість останніх у полі зору становить $(98,3 \pm 1,95)$ у тварин молодого, $(103,00 \pm 2,11)$ – зрілого та $(109,5 \pm 1,02)$ – старечого віку. Серед лейкоцитів переважають нейтрофіли, відсоток яких у тварин молодого віку становить $(91,2 \pm 1,03)$ %, у особин зрілого та старечого віку цей показник дещо зростає до $(92,3 \pm 1,47)$ та $(92,4 \pm 2,08)$ % відповідно. Нейтрофіли є маркерами запалення та виконують захисну функцію щодо ліквідації мікроорганізмів, які колонізували поверхню рани. Окрім нейтрофілів, у мазках із поверхні рани наявні лімфоцити та полібласти, відсоток яких становить $(4,33 \pm 0,44)$ та $(2,9 \pm 0,17)$ % у тварин молодого віку, $(4,2 \pm 0,27)$ та $(2,4 \pm 0,21)$ % – зрілого, $(4,0 \pm 0,16)$ та $(2,1 \pm 0,14)$ % – старечого віку відповідно. Також зустрічаються поодинокі моноцити, що виконують фагоцитарну функцію, а також, очищаючи місце локального запалення від некротичних мас, сприяють регенерації тканин.

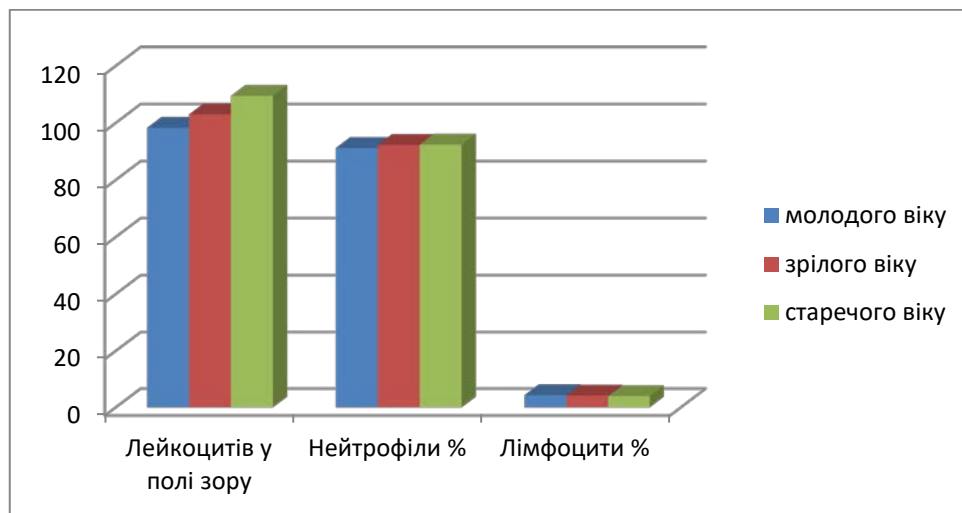


Рисунок 3.13 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів на 1-шу добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

На третю добу спостереження цитологічна картина різко змінюється. Незважаючи на незначне зменшення загальної кількості лейкоцитів – до $(92,4 \pm 2,28)$ % у тварин молодого віку та до $(95,6 \pm 2,3)$ – та $(99,5 \pm 1,24)$ % у щурів зрілого та старечого віку, їх кількісний склад істотно змінюється. Як наслідок відсутності активного запалення в цей термін спостереження, кількість нейтрофілів достовірно зменшилась і становить $(80,7 \pm 2,62)$ % у цитологічних препаратах тварин молодого віку, $(82,4 \pm 1,7)$ % – зрілого та $(86,2 \pm 1,6)$ % – старечого віку, що на 11,51 % ($p = 0,0039$), 10,72 % ($p = 0,0013$) та 6,7 % ($p = 0,0398$) менше порівняно з попереднім терміном. Кількість лімфоцитів та моноцитів у тварин молодого віку достовірно не змінюється і становить $(4,81 \pm 0,41)$ та $(0,7 \pm 0,12)$ % відповідно. У щурів зрілого та старечого віку в даний термін спостереження кількість лімфоцитів становить $(4,1 \pm 0,3)$ та $(3,6 \pm 0,28)$ %, а моноцитів – $(0,8 \pm 0,18)$ та $(1,0 \pm 0,22)$ % відповідно (рис. 3.14).

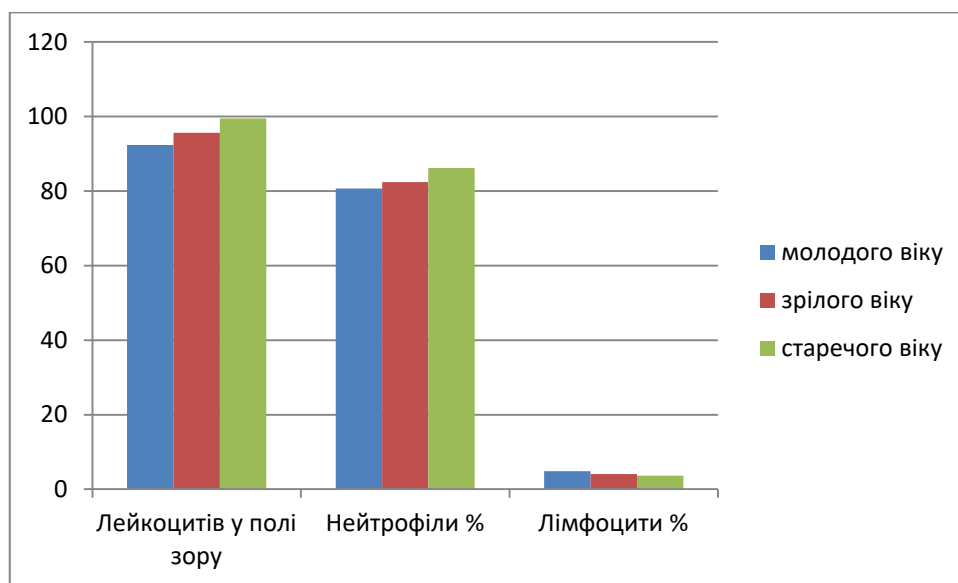


Рисунок 3.14 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів на 3-тю добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

Формування некротичного струпа та наявність бактеріальних тіл приводять до появи макрофагів у щурів молодого віку кількістю $(4,1 \pm 0,3)$ %, у тварин зрілого віку – $(3,8 \pm 0,15)$ % та в особин старечого віку – $(3,0 \pm 0,24)$ %. Через 3-ї доби після завдання дефекту відзначається збільшення відсотка

полібластів у тварин молодого віку до $(6,2 \pm 0,18) \%$, що на $53,22 \%$ ($p \leq 0,0001$) більше порівняно з попереднім терміном спостереження. У щурів зрілого та старечого віку кількість полібластів становила $(5,8 \pm 0,2) \%$ і $(5,7 \pm 0,3)$, що на $58,62 \%$ ($p \leq 0,0001$) та $62,15 \%$ ($p \leq 0,0001$) більше, ніж у тварин аналогічних вікових груп у попередній термін спостереження. Поява макрофагів та зміни в цитологічній картині на 3-тю добу спостереження свідчать про початок очищення рани від некротизованих тканин та є одними з механізмів місцевого імунного захисту. Початок формування грануляційної тканини та утворення нових судин приводять до появи ендотеліоцитів кількістю $(0,8 \pm 0,23)$ та $(0,6 \pm 0,11) \%$ у тварин молодого і зрілого віку відповідно (рис. 3.15). У щурів старечого віку на 3-тю добу спостереження в цитологічних препаратах ендотеліоцити відсутні, що свідчить про уповільнення процесів регенерації з віком. Поява у цитологічних препаратах із поверхні рани у тварин молодого, зрілого та старечого віку поодиноких епітеліоцитів свідчить про початок крайової епітелізації вже через 3 доби після завдання механічного дефекту шкіри лабораторних тварин.

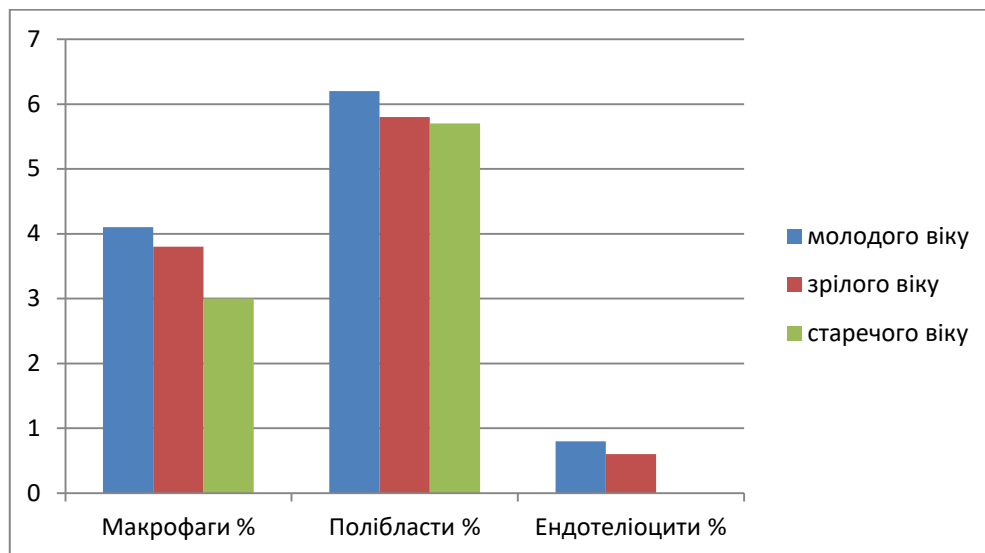


Рисунок 3.15 – Відсоток макрофагів, полібластів та ендотеліоцитів на 3-тю добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

До 7 доби спостереження відбувається значне зменшення запалення рани, про це свідчить зниження кількості лейкоцитів майже утричі, що становить $(24,6 \pm 0,87)$ % у тварин молодого віку, $(28,2 \pm 0,74)$ % – зрілого та $(33,7 \pm 0,59)$ % – старечого віку відповідно. У клітинному складі цитологічних мазків також відбуваються значні зміни, що свідчать про активацію процесів регенерації. Так, наприклад, відсоток нейтрофілів у тварин молодого віку складає лише $(28,7 \pm 1,46)$ %, що на 64,43 % ($p \leq 0,0001$) менше порівняно з попереднім терміном спостереження. У щурів зрілого та старечого віку кількість нейтрофілів становить $(29,6 \pm 1,25)$ % та $(32,1 \pm 1,60)$ %, що на 64,07 % ($p \leq 0,0001$) і 62,76 % ($p \leq 0,0001$) відповідно менше за аналогічні показники в попередній термін спостереження. Також через 7 діб після завдання механічної травми зменшується кількість лімфоцитів та моноцитів до $(2,9 \pm 0,63)$ та $(0,18 \pm 0,09)$ % у молодих тварин, що на 39,7 % ($p = 0,0293$) та на 74,28 % ($p = 0,0061$) менше порівняно з 3-ю добою спостереження. Кількість лімфоцитів у тварин зрілого і старечого віку на 7-му добу спостереження зменшується до $(2,7 \pm 0,14)$ та $(2,3 \pm 0,7)$ %, а кількість моноцитів збільшується до $(1,2 \pm 0,12)$ та $(1,3 \pm 0,1)$ % у тварин зрілого та старечого віку відповідно (рис. 3.16).

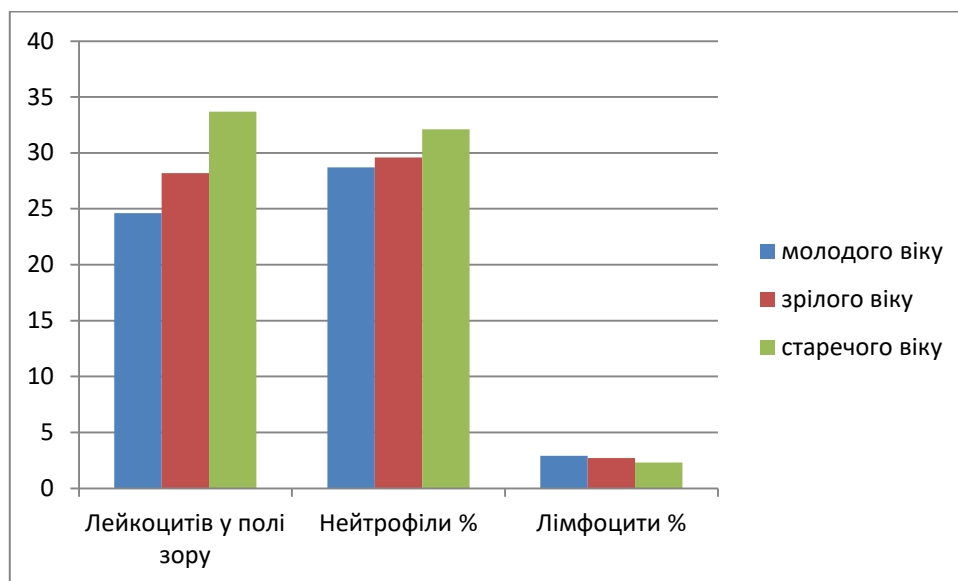


Рисунок 3.16 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів на 7-му добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

При цьому значно зростає кількість клітин, що беруть участь в очищенні рани від детриту та формуванні нових тканин. Кількість макрофагів у цитологічних мазках зростає майже у 5 разів і становить для тварин молодого віку ($19,2 \pm 0,29$) %, зрілого – ($18,7 \pm 0,32$) % та старечого віку – ($15,9 \pm 0,27$) %. Важливо зауважити, що серед них майже не трапляються клітини з незавершеним фагоцитозом чи деструктивного типу, що є свідченням нормального перебігу процесів очищення рани. Одночасно майже утричі зростає кількість полібластів і становить ($15,3 \pm 0,18$), ($14,7 \pm 0,13$) та ($16,9 \pm 0,22$) % відповідно до віку. На 7-му добу спостереження в мазках вперше з'являються фібробласти – ці клітини є основним субстратом формування сполучної тканини. Їх кількість у щурів молодого, зрілого та старечого віку становить ($18,3 \pm 0,2$), ($14,1 \pm 0,17$) і ($9,4 \pm 0,3$) % відповідно. Кількість ендотеліоцитів у тварин молодого віку зростає до ($5,9 \pm 0,22$) %, що майже в 6 разів більше, ніж у попередній термін спостереження, та опосередковано свідчить про активність процесів ангиогенезу. В особин зрілого та старечого віку кількість ендотеліоцитів збільшується значно повільніше і на 7-му добу спостереження становить лише ($3,5 \pm 0,14$) та ($2,7 \pm 0,16$) % відповідно (рис. 3.17).

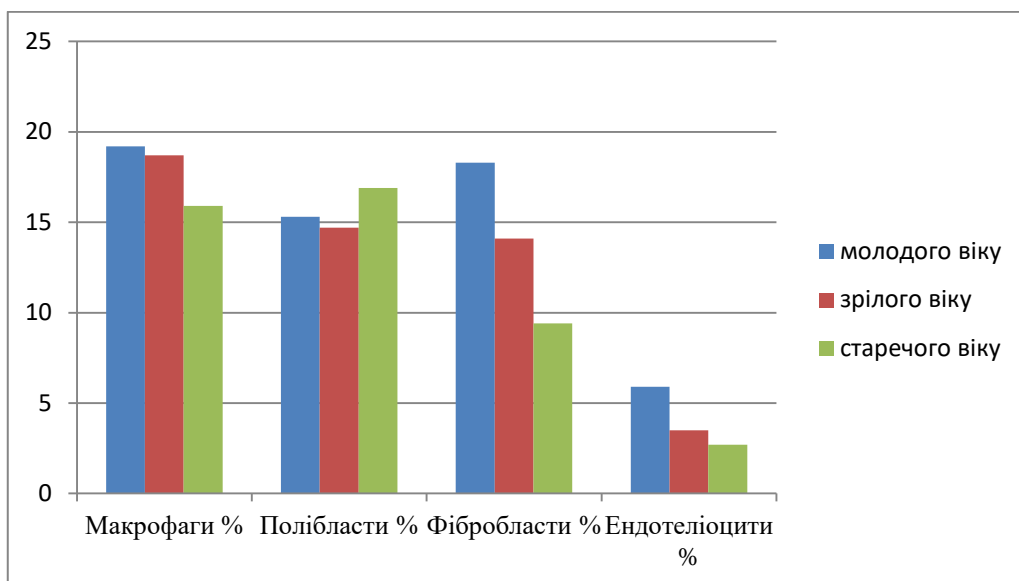


Рисунок 3.17 – Відсоток макрофагів, полібластів, фібробластів та ендотеліоцитів на 7-му добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

Зважаючи на такі показники, можна зробити висновок, що активність утворення нових судин із віком уповільнюється. На відміну від попереднього терміну спостереження епітеліоцити виявляються в мазках як на периферії, так і в центральних ділянках рани.

Через 14 днів після завдання травми незначно, проте достовірно зменшилася кількість лейкоцитів, а саме у тварин молодого віку на 15,44 % ($p = 0,0289$), та становила $(20,8 \pm 1,21)$ у полі зору, зрілого – на 12,76 % ($p \leq 0,0145$), що становило $(24,6 \pm 0,97)$, і у щурів старечого віку кількість лейкоцитів становила $(25,5 \pm 1,59)$ у полі зору, що на 24,33 % ($p = 0,0007$) менше порівняно з попереднім терміном спостереження. Це також стосується нейтрофілів і лейкоцитів, відсоток яких становить $(26,1 \pm 1,47)$ і $(2,6 \pm 0,19)$ % у тварин молодого віку, $(27,6 \pm 1,85)$ і $(2,6 \pm 0,25)$ % – зрілого та $(30,1 \pm 1,34)$ % і $(2,5 \pm 0,13)$ % – старечого віку відповідно. Порівняно з попереднім терміном спостереження кількість моноцитів у молодих тварин зростає до $(1,2 \pm 0,15)$ %, а в особин двох інших вікових груп, навпаки, зменшується до $(1,1 \pm 0,17)$ та $(1,0 \pm 0,26)$ % відповідно (рис. 3.18).

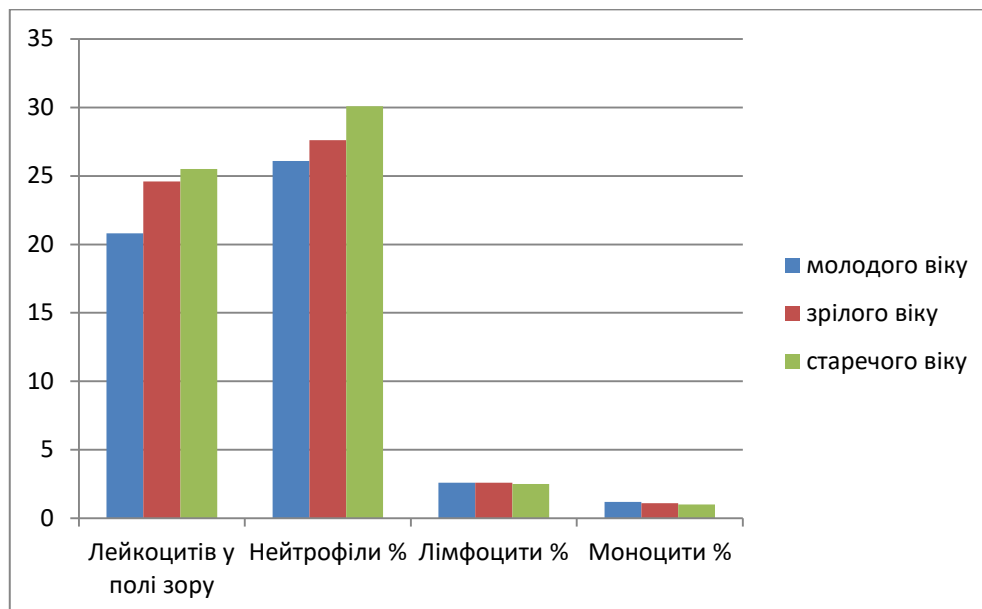


Рисунок 3.18 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів на 14-ту добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

Кількість макрофагів та полібластів порівняно з попереднім терміном спостереження істотно не змінюється. При цьому кількість клітин, які формують нові тканинні структури – фібробластів та ендотеліоцитів, – зростає до $(21,5 \pm 1,1) \%$ та $(8,4 \pm 0,22) \%$ у тварин молодого віку, що на $17,48 \%$ ($p = 0,0169$) та $42,37 \%$ ($p \leq 0,0001$) відповідно більше порівняно з попереднім терміном (рис. 3.19). Ця тенденція зберігається і в інших вікових групах. Загалом цитологічна картина на 14-ту добу характеризується активізацією гісто- та ангиогенезу.

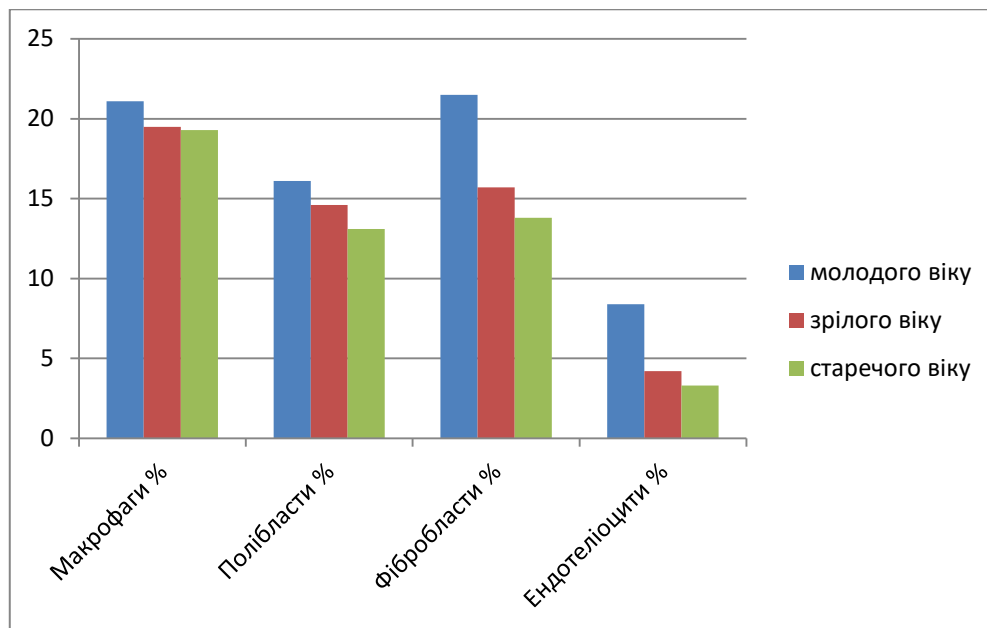


Рисунок 3.19 – Відсоток макрофагів, полібластів, фібробластів та ендотеліоцитів на 14-ту добу в цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

Наприкінці спостереження через 21-шу добу після завдання травми у мазках із поверхні шкіри тварин кількість лейкоцитів перебуває на рівні, звичайному для щурів відповідної вікової категорії, а саме: у тварин молодого віку – $(7,65 \pm 0,53)$ в полі зору, зрілого – $(9,2 \pm 0,53)$ та старечого – $(11,6 \pm 0,36)$ відповідно. Клітинний склад характеризується майже повною відсутністю запальних клітин, відсоток яких становить: $(14,9 \pm 0,39) \%$ для нейтрофілів та $(1,70 \pm 0,17) \%$ для лімфоцитів у тварин молодого віку, $(15,2 \pm 0,22)$ та $(1,6 \pm 0,12) \%$ – зрілого, $(17,4 \pm 0,31)$ та $(1,2 \pm 0,14) \%$ – старечого віку (рис. 3.20).

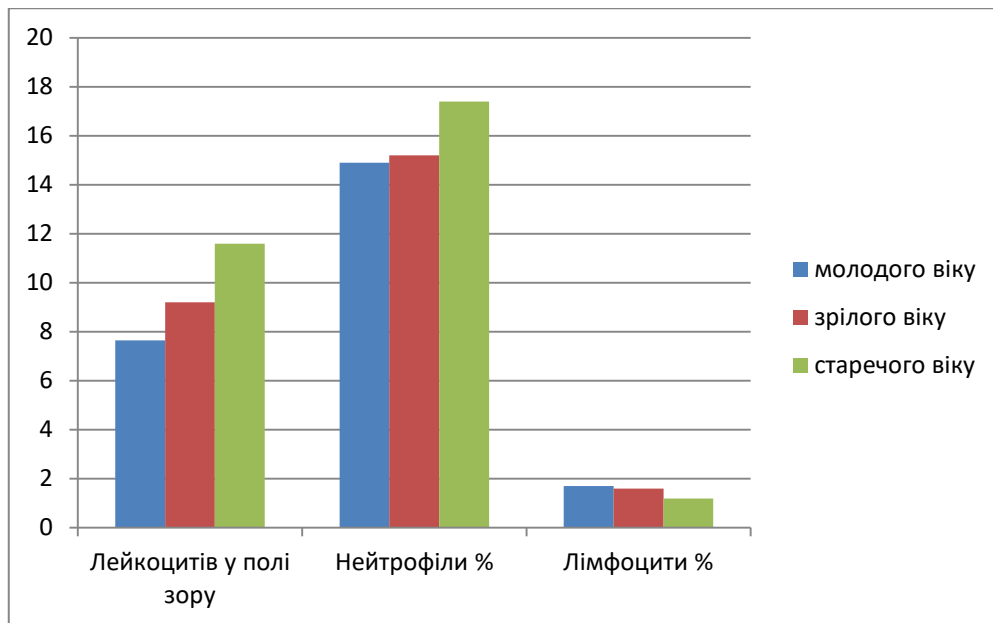


Рисунок 3.20 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів на 21-шу добу в цитологічних препаратах із поверхні шкіри тварин різних вікових груп контрольної серії

На 21-шу добу активні макрофаги відсутні, що може свідчити про повне очищення рани, спостерігається лише незначна кількість полібластів. Натомість кількість фібробластів та ендотеліоцитів значно зростає і становить $(34,7 \pm 0,55)$ та $(11,1 \pm 0,49)$ % відповідно у тварин молодого віку, що на $61,39$ % ($p \leq 0,0001$) та $32,14$ % ($p = 0,0005$) більше порівняно з попереднім терміном спостереження. У щурів зрілого і старечого віку кількість фібробластів та ендотеліоцитів збільшується майже удвічі, що становить $(35,3 \pm 0,87)$ та $(8,7 \pm 0,81)$ % – зрілого та $(30,2 \pm 0,42)$ і $(6,4 \pm 0,43)$ % – старечого віку відповідно (рис. 3.21). Зважаючи на майже повне загоєння ран, що підтверджено методом планіметрії, в мазках із поверхні шкіри візуалізуються значні пласти епітеліоцитів.

Застосування інноваційних матеріалів на основі хітозану при механічній травмі шкіри у тварин молодого віку вже наприкінці першої доби приводить до зменшення кількості лейкоцитів на $6,30$ % ($p = 0,1229$) порівняно з контрольними показниками, що становить $(92,1 \pm 3,12)$ клітин у полі зору.

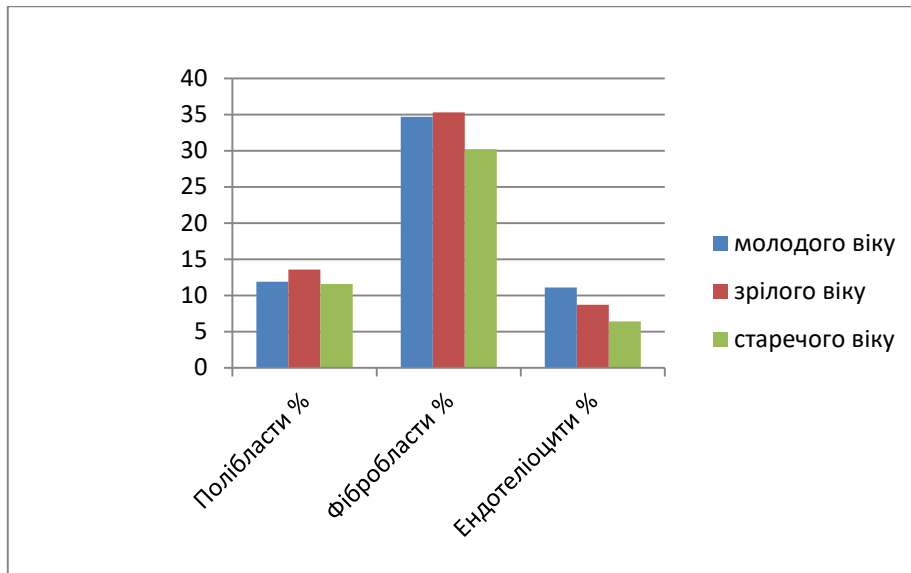


Рисунок 3.21 – Відсоток макрофагів, полібластів, фібробластів та ендотеліоцитів на 21-шу добу в цитологічних препаратах із поверхні рани тварин різних вікових груп контрольної серії

Протизапальна властивість мембран приводить до незначного, проте достовірного – 4,27 % ($p = 0,0383$) – зменшення кількості нейтрофілів, вміст яких становить ($87,3 \pm 1,27$) % (рис. 3.22).

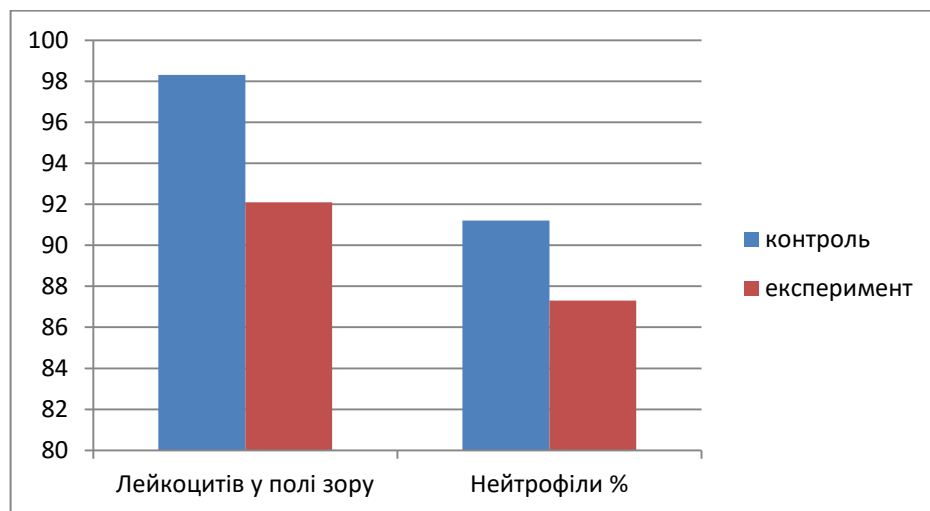


Рисунок 3.22 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 1-шу добу після травми

Ця кількість нейтрофілів здатна забезпечити активацію імунних процесів у рані, проте не є критичною для розвитку запалення. Вміст лімфоцитів та моноцитів зменшується недостовірно до ($4,5 \pm 0,8$) % ($p = 0,856$) та ($0,6 \pm 0,12$)

% ($p = 0,7342$) відповідно. Водночас відбувається достовірне зростання кількості полібластів до $(5,62 \pm 0,42)$ % ($p \leq 0,0001$), що майже удвічі перевищує контрольні показники в аналогічний термін спостереження (рис. 3.23).

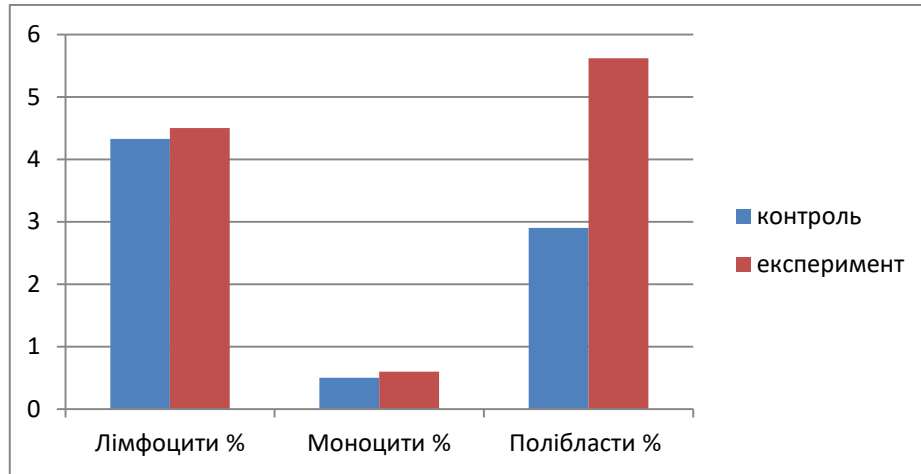


Рисунок 3.23 – Відсоток лімфоцитів, моноцитів та полібластів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 1-шу добу після травми

Загальна кількість лейкоцитів у рані на 3-тю добу після завдання механічної травми зменшується до $(83,2 \pm 2,12)$ в полі зору, що на 9,96 % ($p = 0,0144$) менше порівняно з аналогічними показниками контрольної серії. Як і в попередній термін спостереження, кількість нейтрофілів достовірно менша порівняно з тваринами, яким проводили стандартне лікування (рис. 3.24). Відсоток нейтрофілів менший порівняно з контролем на 5,57 % ($p = 0,2044$) і становить $(76,2 \pm 2,03)$ %. Відсоток макрофагів майже удвічі перевищує контроль і становить $(9,2 \pm 0,33)$ % ($p \leq 0,0001$), що свідчить про можливість більш швидкого очищення поверхні рани від некротичних тканин та мікробних тіл. На відміну від контрольних показників на 3-тю добу спостереження при застосуванні хітозанових мембран в цитологічних препаратах спостерігаються фіброласти кількістю $(1,5 \pm 0,14)$ %.

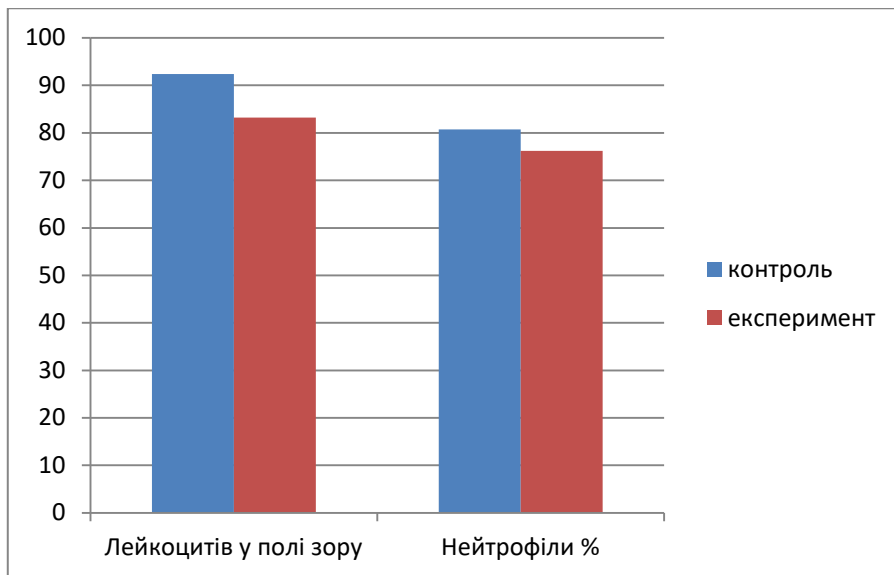


Рисунок 3.24 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Відомо, що олігомери хітозану, які утворюються під час його деградації, здатні стимулювати міграцію фібробластів [43]. Показником ефективності застосування інноваційного лікування є також зростання відсотка ендотеліоцитів більше ніж утричі (рис. 3.25), що свідчить про більшу активність процесів ангіогенезу при застосуванні хітозанових мембран.

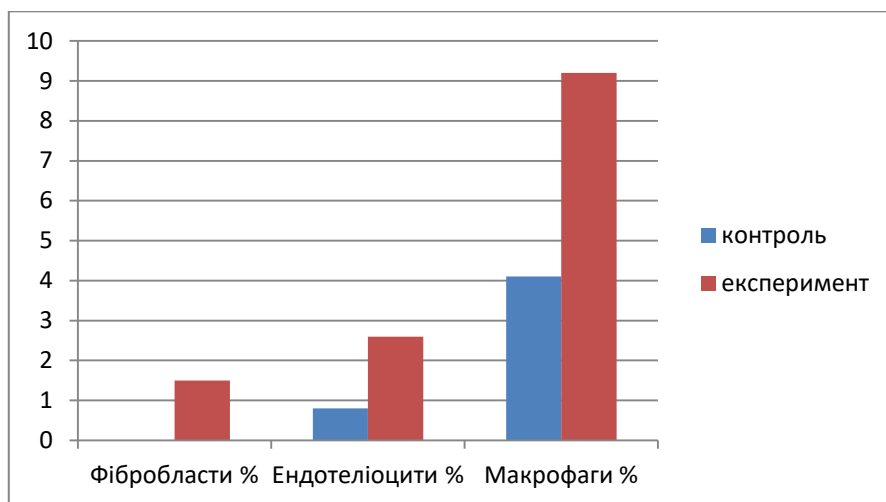


Рисунок 3.25 – Відсоток фібробластів, ендотеліоцитів та макрофагів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

На 7-му та 14-ту доби спостереження відбувається подальше зменшення лейкоцитів порівняно з контролем до $(20,1 \pm 0,98)$ та $(18,1 \pm 1,01)$ у полі зору

відповідно. Кількість нейтрофілів зменшується незначно і становить ($26,4 \pm 1,33$) % на 7-му добу та ($24,6 \pm 0,42$) % на 14-ту добу відповідно. На відміну від попереднього терміну спостереження кількість лімфоцитів через 7 та 14 діб після завдання механічної травми достовірно не відрізняється і становить ($3,3 \pm 0,62$) та ($2,0 \pm 0,27$) % на 7-му та 14-ту добу відповідно.

Кількість моноцитів та полібластів також перебуває на рівні контрольних показників. Відсутність значної динаміки в порівнянні з контролем свідчить про відсутність активного запалення у даній групі тварин та специфічного субстрату для хітозанових мембран. При цьому кількість макрофагів достовірно зростає до ($22,1 \pm 0,52$) % на 7-му та ($29,4 \pm 1,12$) % на 14-ту доби, що на 13,12 % ($p = 0,0007$) та 28,23 % ($p \leq 0,0001$) більше порівняно з контролем.

Як відомо, хітозан здатний до стимуляції активації макрофагів, пришвидшуючи процеси очищення рани від залишків некротичних тканин та мікроорганізмів. Проте в зазначений термін спостереження кількість фібробластів становить ($23,2 \pm 1,18$) % через 7 днів та ($26,4 \pm 1,1$) % через – 14 днів після травми і перевищує контроль на 26,77 % ($p = 0,0022$) і 22,79 % ($p = 0,0103$) відповідно. Вміст ендотеліоцитів також зростає до ($7,2 \pm 0,44$) % та ($9,6 \pm 0,25$) %, що на 22,03 % ($p = 0,0246$) та 14,28 % ($p = 0,0048$) відповідно більше, ніж аналогічні показники контрольної серії тварин (рис. 3.26).

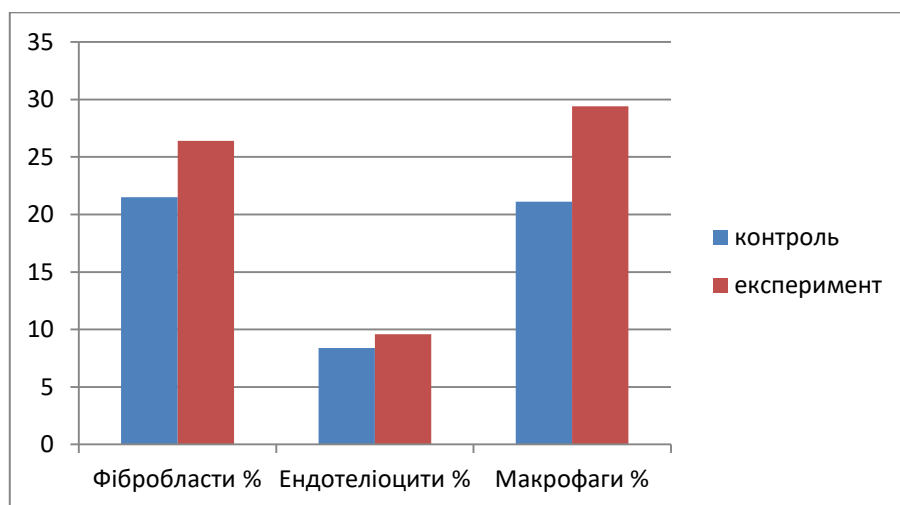


Рисунок 3.26 – Відсоток фібробластів, ендотеліоцитів та макрофагів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 14-ту добу після травми

Разом зазначені показники свідчать про активацію процесів формування нових тканин і судин в умовах застосування хітозанових мембран. У полі зору цитологічного препарату спостерігається наявність пластів епітеліоцитів як у центральних, так і в периферичних ділянках рани.

Використання хітозанових мембран приводить до значного зменшення кількості лейкоцитів у останній термін спостереження – $(2,93 \pm 0,33)$ у полі зору, що на 61,69 % ($p \leq 0,0001$) менше порівняно з контрольними показниками. Майже утричі зменшується кількість нейтрофілів і становить $(5,1 \pm 0,17)$ % (рис. 3.27).

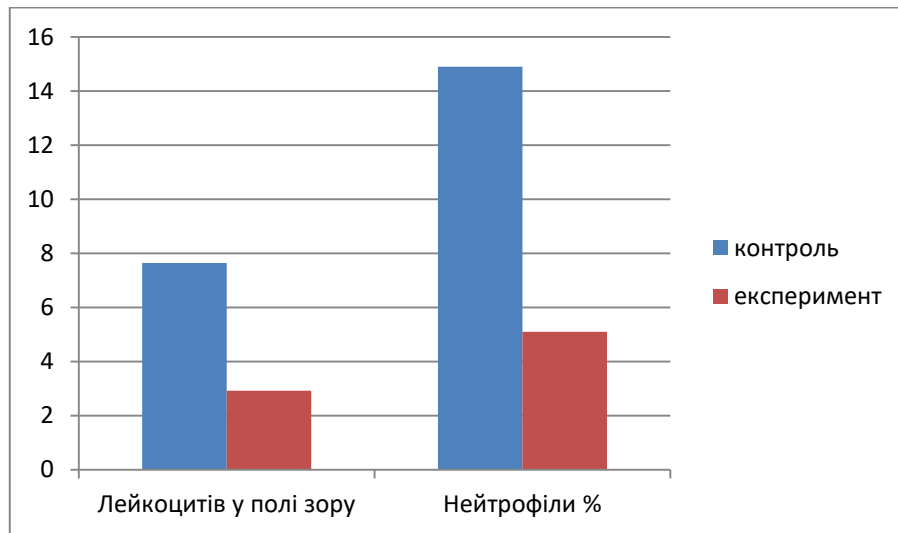


Рисунок 3.27 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 21-шу добу після травми

Кількість лімфоцитів змінюється недостовірно порівняно з контролем, що становить $(1,5 \pm 0,12)$ % ($p = 0,3591$). Вміст фібробластів у цитологічних мазках тварин експериментальної серії зменшується на 13,25 % ($p \leq 0,0001$) порівняно з показниками контрольної серії тварин (рис. 3.28), що становить $(30,1 \pm 0,31)$ % та можливо свідчить про завершення формування тканин у рані. Натомість відсоток ендотеліоцитів зростає до $(14,6 \pm 0,52)$ %, що на 31,53 % ($p = 0,0006$) більше від аналогічних показників у тварин контрольної серії.

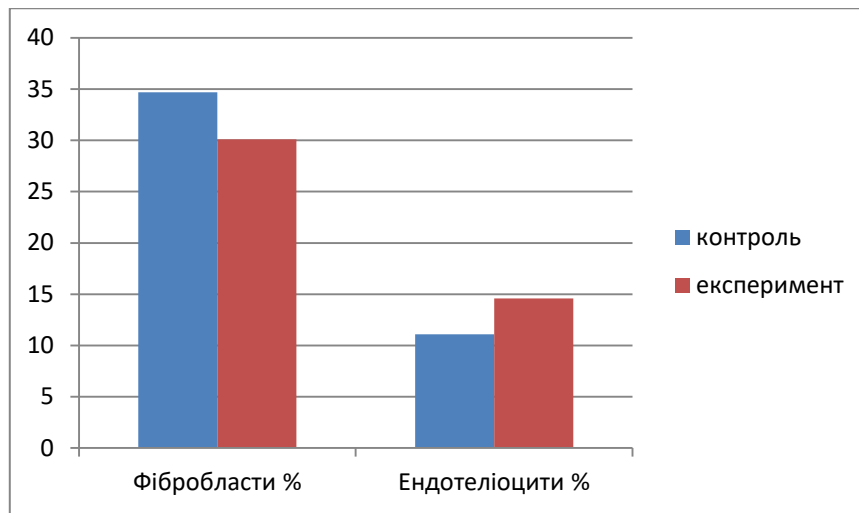


Рисунок 3.28 – Відсоток фібробластів та ендотеліоцитів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій на 21-шу добу після травми

Застосування хітозанових мембран при механічній травмі шкіри у тварин зрілого віку вже з першої доби змінює цитологічну картину регенерату. Так, кількість лейкоцитів зменшується до $(95,7 \pm 2,06)$ клітин у полі зору, що на 7,08 % ($p = 0,0292$) менше порівняно з аналогічними показниками контрольної серії (рис. 3.29). В даний термін спостереження відбувається достовірне зменшення вмісту нейтрофілів до $(88,6 \pm 3,79)$ %. Різниця показників становить 2,85 % ($p = 0,3841$), що може бути наслідком наявності у хітозану протизапальних та антибактеріальних властивостей.

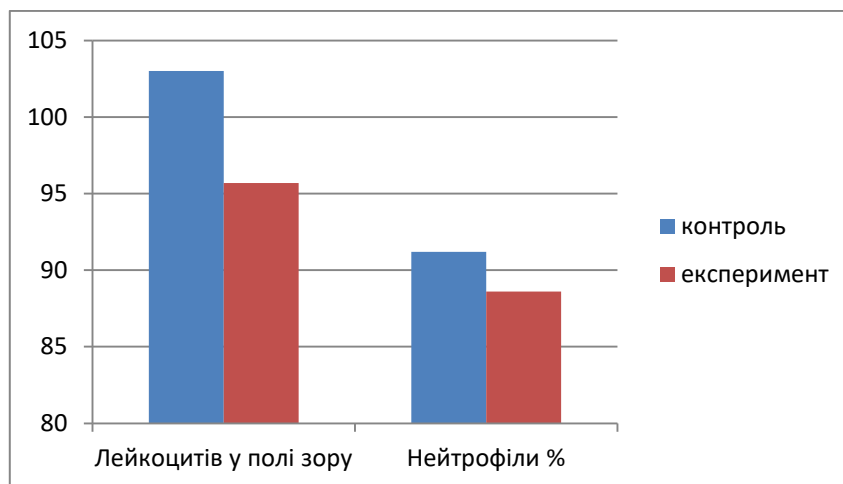


Рисунок 3.29 Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 1-шу добу після травми

Відсоток полібластів збільшується майже удвічі й становить $(4,7 \pm 0,23)$ %, що забезпечує більш швидке очищення рани. При цьому вміст моноцитів та лімфоцитів достовірно не відрізняється від контролю, становлячи $(0,7 \pm 0,26)$ та $(4,3 \pm 0,34)$ % відповідно.

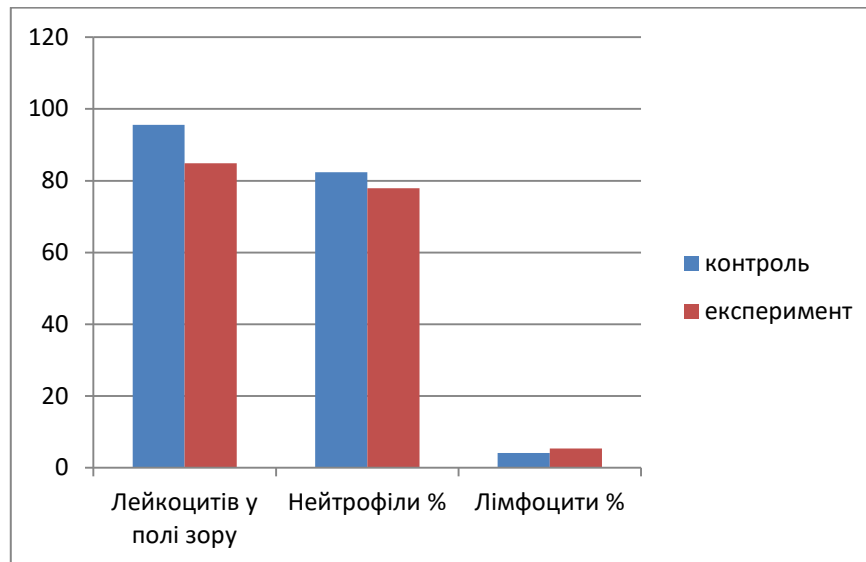


Рисунок 3.30 – Кількість лейкоцитів та відсоток клітин запалення у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Кількість моноцитів та макрофагів більше ніж удвічі перевищує аналогічні показники контрольної серії (рис. 3.31), що становить $(2,7 \pm 0,34)$ % ($p = 0,0006$) та $(7,8 \pm 0,46)$ % ($p \leq 0,0001$) відповідно і сприяє швидшому очищенню поверхні рани. Рівень полібластів на даний термін спостереження істотно не відрізняється від контролю. Поява ендотеліоцитів у цитологічних препаратах експериментальної серії тварин зрілого віку вже на третю добу спостереження свідчить про початок регенераторних процесів у рані. Крім того, в цитологічних мазках на периферії дефекту відзначається поява поодиноких епітеліоцитів, що також свідчить про активізацію процесів регенерації.

Через 7 днів після завдання дефекту в експериментальній серії тварин цитологічна картина мазків свідчить про активний перебіг регенерації та початок процесів епітелізації. Кількість лейкоцитів зменшується майже утричі

порівняно з попереднім терміном спостереження і становить $(26,1 \pm 1,57)$ клітин у полі зору, що на 7,44 % ($p = 0,2541$) менше, ніж у показниках контрольної серії.

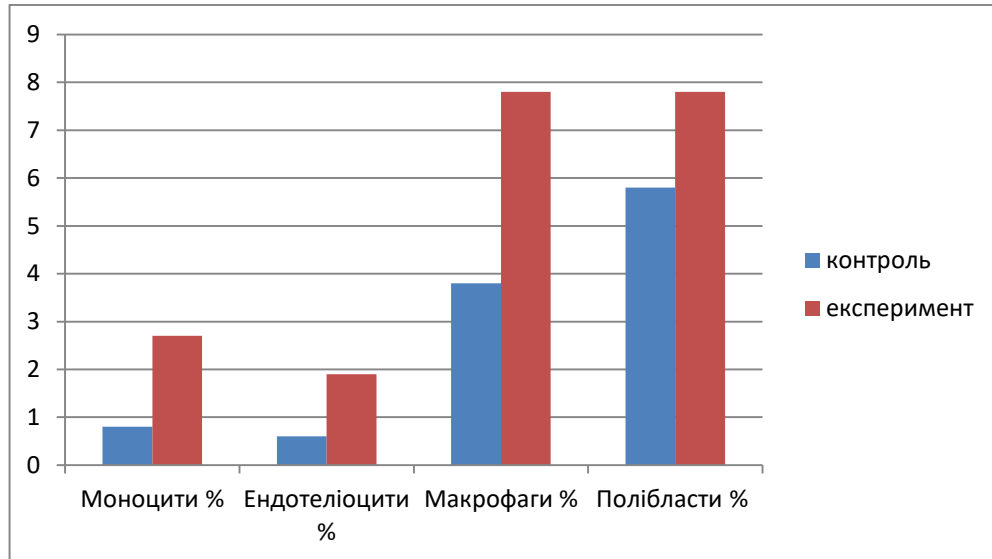


Рисунок 3.31 – Відсоток моноцитів, ендотеліоцитів, макрофагів та полібластів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Вміст нейтрофілів та лімфоцитів порівняно з контролем істотно не змінюється (рис. 3.32). При цьому спостерігається значне зростання вмісту макрофагів та фібробластів порівняно з попереднім терміном спостереження. Відсоток цих клітин становить $(21,4 \pm 0,76)$ та $(19,3 \pm 1,02)$ % відповідно, що на 14,43 % ($p = 0,0084$) та 36,87 % ($p = 0,0005$) більше від контрольних показників.

Ці зміни свідчать про більш швидке очищення поверхні рани та синтез нового позаклітинного матриксу у тварин експериментальної серії. Наявність майже удвічі більшої кількості ендотеліоцитів у мазках засвідчує активність процесів неоваскулогенезу в новоутвореному матриксі. На відміну від контрольної серії епітеліоцити в мазках із поверхні дефекту тварин експериментальної серії розміщені як окремо, так і шарами, що свідчить про початок процесів епітелізації, яка розпочинається від периферичних ділянок рани.

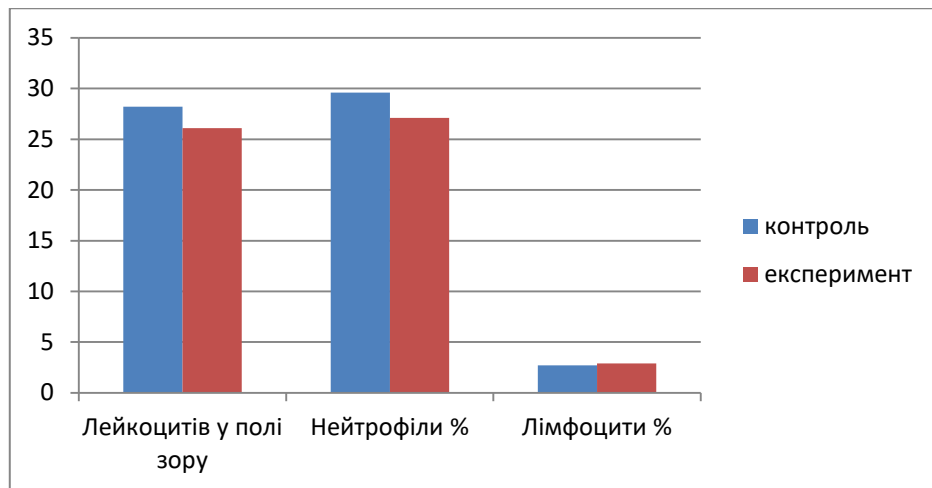


Рисунок 3.32 – Кількість лейкоцитів та відсоток клітин запалення у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 7-му добу після травми

Через 14 днів після завдання механічної травми на шкірі цитологічна картина мазків із поверхні рани майже не відрізняється від попереднього терміну спостереження й характеризується зменшенням лейкоцитарної інфільтрації та ознаками активації процесів регенерації. У клітинному складі спостерігається незначне зменшення вмісту нейтрофілів і лімфоцитів (рис. 3.33).

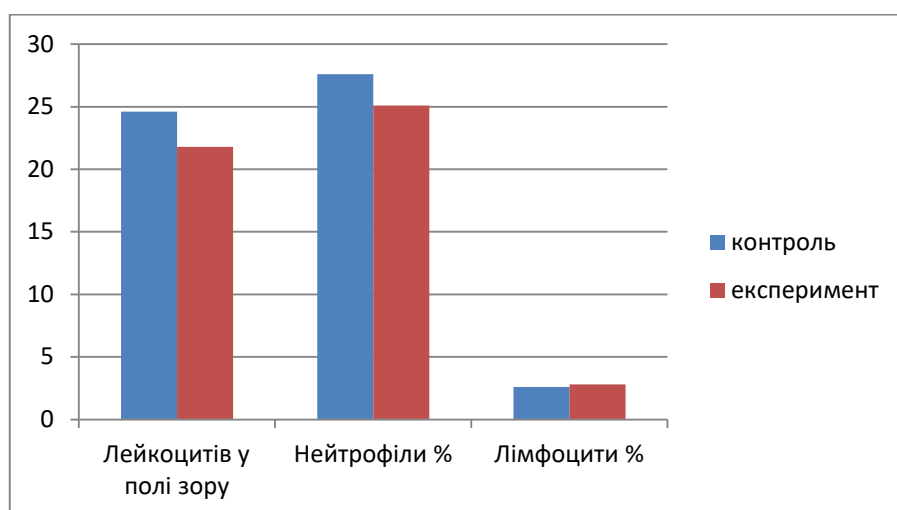


Рисунок 3.33 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 14-ту добу після травми

При цьому вміст фібробластів та ендотеліоцитів у тварин експериментальної серії зрілого віку перевищує контроль на 22,29 % ($p = 0,0023$) та 59,52 % ($p = 0,0048$) відповідно, що становить $(19,2 \pm 0,71)$ % для фібробластів та $(6,7 \pm 0,16)$ % для ендотеліоцитів (рис. 3.34). Ці зміни свідчать про активність процесів синтезу міжклітинного матриксу та васкулогенезу. В цитологічних препаратах епітеліоцити розміщені великими групами, які формують шари. Така картина характерна для фази епітелізації, що в даний термін спостереження є показником ефективності застосування хітозанових мембран для лікування пошкоджень шкіри механічного генезу.

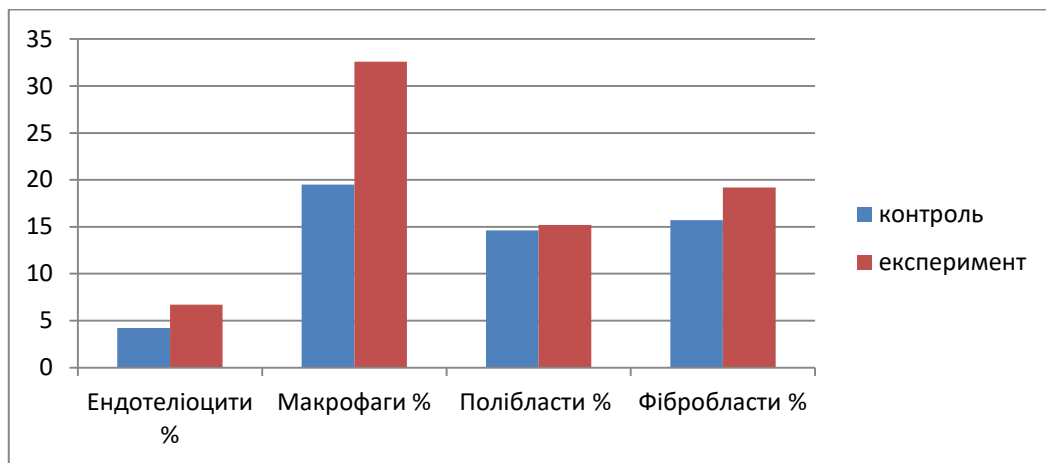


Рисунок 3.34 – Відсоток ендотеліоцитів, макрофагів, полібластів та фібробластів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 14-ту добу після травми

На 21-шу добу після завдання механічної травми шкіри тварин експериментальної серії цитологічна картина мазків із поверхні дефекту свідчить про завершення регенерації шкіри, її епітелізацію та відсутність запальної й інфільтративної реакції. Лейкоцити спостерігаються в поодиноких мазках, їх загальна кількість становить лише $(5,65 \pm 0,42)$ у полі зору, що на 38,58 % ($p = 0,0004$) менше від контрольних показників. Відсоток нейтрофілів майже утричі менший, ніж контроль, і становить $(5,5 \pm 0,22)$ % ($p \leq 0,0001$) (рис. 3.35). Рівень полібластів становить $(14,9 \pm 0,28)$ %, що на 9,55 % ($p = 0,0145$) відповідно більше порівняно з аналогічними показниками

контрольної серії. Вміст фібробластів та ендотеліоцитів незначно відрізняється від контрольних показників і становить $(31,4 \pm 0,48) \%$ ($p = 0,0028$) та $(10,1 \pm 0,36) \%$ ($p = 0,1453$) відповідно. Як і в контролі, основними клітинними елементами цитологічних препаратів є епітеліоцити, що формують суцільні пласти.

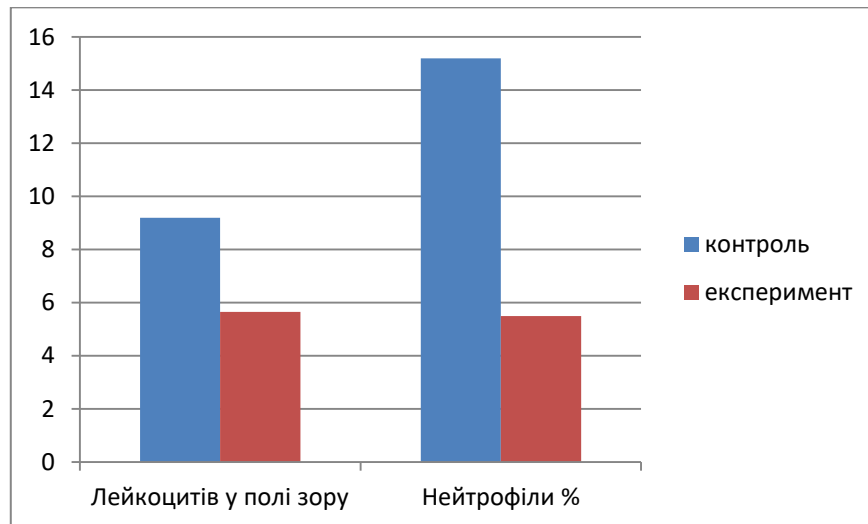


Рисунок 3.35 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів у цитологічних препаратах з поверхні рани шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій на 21-шу добу після травми

Цитологічна картина регенерату на першу добу спостереження у тварин старечого віку при застосуванні хітозанових мембран із метою лікування механічної травми шкіри майже не відрізняється порівняно з аналогічними показниками у тварин зрілого віку.

Отже, кількість лейкоцитів та нейтрофілів порівняно з контролем відрізняється достовірно і становить до $(97,4 \pm 1,86)$ клітин у полі зору та $(90,1 \pm 3,12) \%$, що на 11,05 % ($p = 0,0002$) та 2,48 % ($p = 0,5353$) відповідно менше. Ця тенденція є підтвердженням наявності протизапальної та антибактеріальної дій у хітозанових плівках. Відсоток полібластів майже удвічі перевищує контроль та становить $(4,1 \pm 0,62) \%$ ($p = 0,0104$). При цьому вміст лімфоцитів достовірно не відрізняється від контролю, становлячи $(4,1 \pm 0,25) \%$ ($p = 0,7431$).

Уже через 3 доби спостереження в експериментальній серії тварин спостерігається достовірне зменшення вмісту лейкоцитів та відсотка нейтрофілів, що становить $(87,6 \pm 2,2)$ у полі зору і $(81,2 \pm 2,88)$ % та на $11,95$ % ($p = 0,0008$) і на $5,80$ % ($p = 0,1601$) менше порівняно з показниками контрольної серії. Вміст лімфоцитів при цьому становить $(4,2 \pm 1,12)$ %, що на $16,67$ % ($p = 0,6146$) перевищує контрольні показники (рис. 3.36).

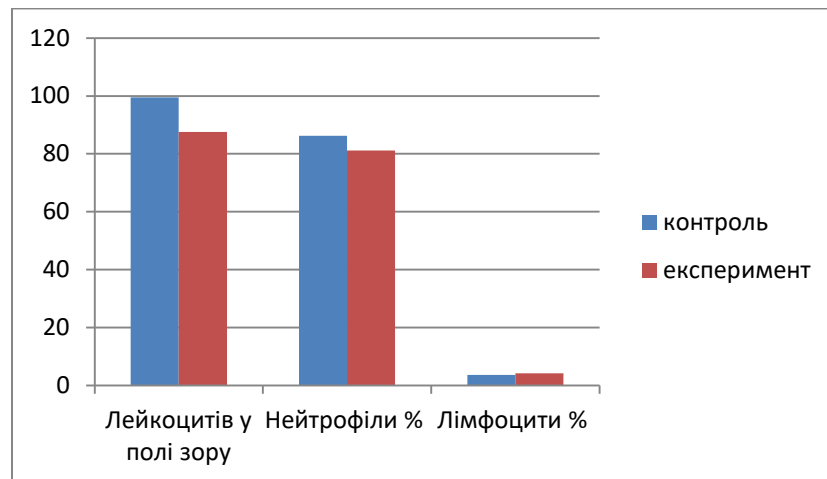


Рисунок 3.36 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин старечого віку контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Кількість моноцитів майже утричі більша, ніж у цитологічних препаратах тварин контрольної серії та становить $(3,4 \pm 0,63)$ % ($p = 0,0049$) відповідно. Рівень полібластів в даний термін спостереження істотно не змінюється. Вміст макрофагів у тварин експериментальної серії старечого віку значно перевищує контроль (рис. 3.37), становлячи $(7,1 \pm 0,24)$ % ($p \leq 0,0001$), та сприяє більш швидкому очищенню поверхні рани від некротизованих тканин. Поява ендотеліоцитів та епітеліоцитів у цитологічних препаратах є підтвердженням початку активації процесів регенерації.

Через 7 днів після нанесення дефекту в експериментальній серії тварин цитологічна картина мазків свідчить про активний перебіг регенерації та початок процесів епітелізації. Кількість лейкоцитів у мазку зменшується до $(28,8 \pm 1,72)$, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів порівняно з контрольними показниками істотно не змінюється.

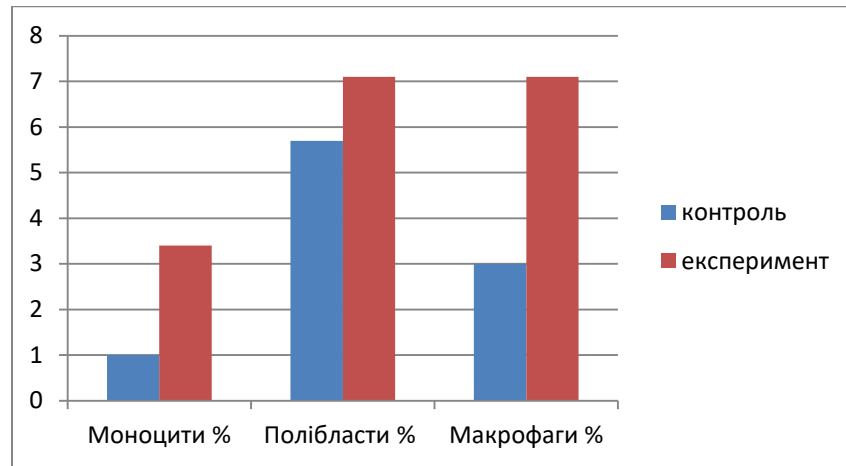


Рисунок 3.37 – Відсоток моноцитів, полібластів та макрофагів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин старечого віку контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

При цьому спостерігається значне зростання вмісту макрофагів та фібробластів, як порівняно з попереднім терміном спостереження, так і з контролем (рис. 3.38). Відсоток даних клітин становить $(18,2 \pm 0,61)$ і $(10,1 \pm 0,86)$ %, що на 14,46 % ($p = 0,0062$) та 7,44 % ($p = 0,4599$) перевищує показники контрольної серії. Епітеліоцити в мазках із поверхні дефекту тварин експериментальної серії на відміну від контрольної серії розміщені як окремо, так і пластами, що свідчить про початок процесів епітелізації.

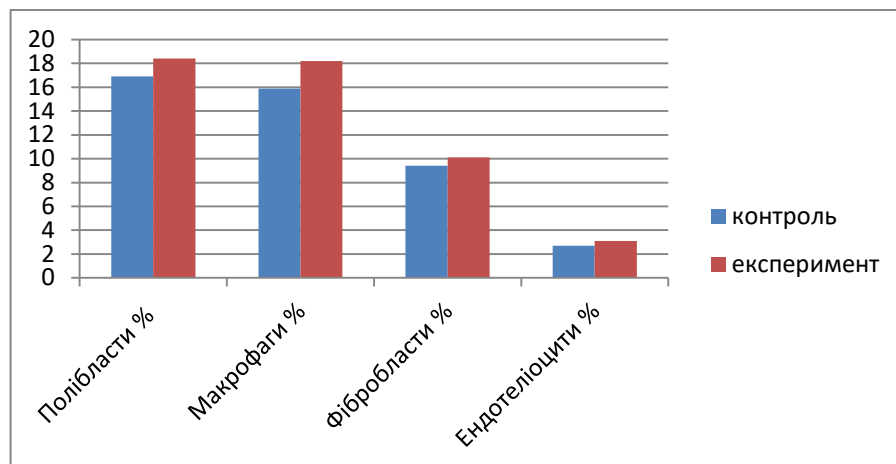


Рисунок 3.38 – Відсоток полібластів, макрофагів, фібробластів та ендотеліоцитів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин старечого віку контрольної та експериментальної серій на 7-му добу після травми

На 14-й день спостереження цитологічна картина мазків із поверхні рани у тварин старечого віку майже не відрізняється порівняно з аналогічною, як у тварин зрілого віку, так і попередній термін спостереження, і характеризується зменшенням лейкоцитарної інфільтрації та ознаками активації процесів регенерації. Відзначається незначне зменшення вмісту нейтрофілів та лімфоцитів. При цьому вміст фібробластів та ендотеліоцитів у тварин експериментальної серії перевищує контроль на 21,73 % ($p = 0,0024$) та на 57,57 % ($p = 0,0020$), що становить $(16,8 \pm 0,36)$ % для фібробластів та $(5,2 \pm 0,44)$ % для ендотеліоцитів відповідно. У цитологічних мазках епітеліоцити скупчуються великими групами, які формують пласти, що є показником активації процесів синтезу міжклітинного матриксу та васкулогенезу.

Через 21 добу спостереження у тварин експериментальної серії старечого віку цитологічна картина свідчить про завершення регенерації шкіри, майже повну епітелізацію та відсутність запальної та інфільтративної реакції на поверхні рани після завдання механічної травми. В поодиноких мазках спостерігаються лейкоцити, кількість яких становить лише $(3,8 \pm 0,36)$ у полі зору. Відсоток нейтрофілів та полібластів становить лише $(10,6 \pm 0,44)$ та $(12,6 \pm 0,36)$ % , що на 39,08 % ($p \leq 0,0001$) та 8,62 % ($p = 0,0457$) відповідно менше порівняно з аналогічними показниками контрольної серії (рис. 3.39).

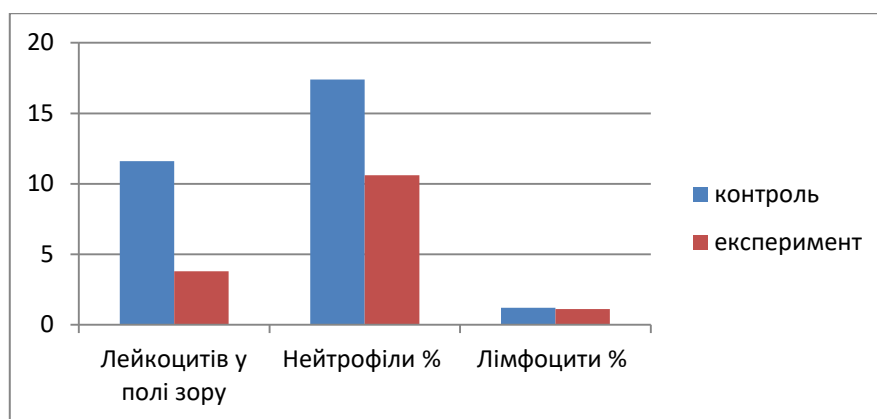


Рисунок 3.39 – Кількість лейкоцитів та відсоток нейтрофілів і лімфоцитів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин старечого віку контрольної та експериментальної серій на 21-шу добу після травми

Вміст фібробластів та ендотеліоцитів не значно, проте достовірно відрізняється від контрольних показників та становить відповідно $(27,1 \pm 0,06)$ ($p = 0,0216$) та $(8,2 \pm 0,13) \%$ ($p = 0,0025$) для щурів старечого віку експериментальної серії (рис. 3.40). Основними клітинними елементами цитологічних препаратів через 21-шу добу після завдання механічної травми на шкіру тварин старечого віку є епітеліоцити, які формують суцільні пласти.

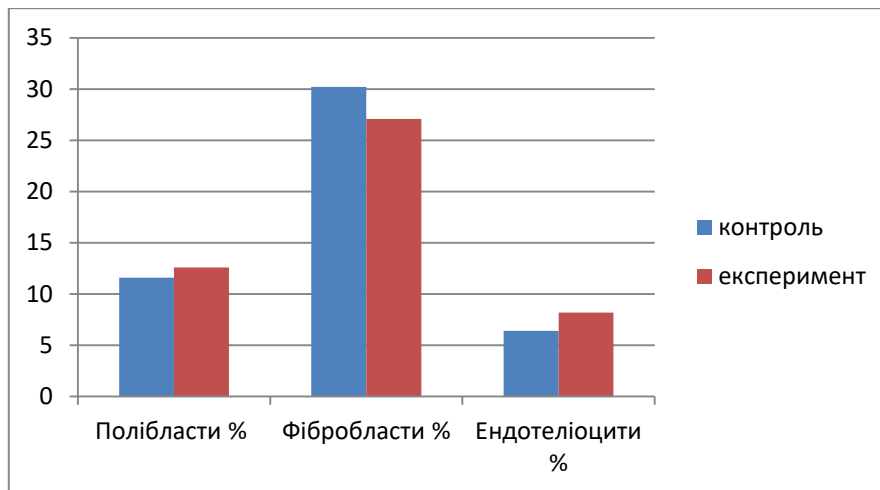


Рисунок 3.40 – Відсоток полібластів, фібробластів та ендотеліоцитів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин старечого віку контрольної та експериментальної серій на 21-шу добу після травми

Таким чином, за даними цитологічного дослідження мазків із поверхні дефекту, застосування хітозанових мембран для лікування механічних пошкоджень шкіри приводить до зменшення нейтрофільно-лімфоцитарної інфільтрації, зростання вмісту макрофагів у першій фазі регенерації та прискорення процесів утворення міжклітинного матриксу і процесів епітелізації у другій та третій фазах перебігу ранового процесу.

3.4 Зміни гістологічної будови та морфометричних параметрів ділянки шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії

Через три доби після механічної травми шкіри у тварин молодого віку контрольної серії відзначається формування струпа, під яким відмічається наявність лімфоцитарно-нейтрофільного валу, який відмежовує неушкоджені ділянки дерми. У дермі збережені волосяні фолікули та залози шкіри. Підшкірна жирова клітковина та дерма є набряклою, кровоносні судини розширені, переповнені еритроцитами, інколи відзначається крововилив. Для цього терміну характерні периваскулярний та стромальний набряки, що, можливо, є наслідком вираженої судинної реакції на травму. В поверхневих шарах дефекту відзначається наявність поодиноких макрофагів (рис. 3.41).

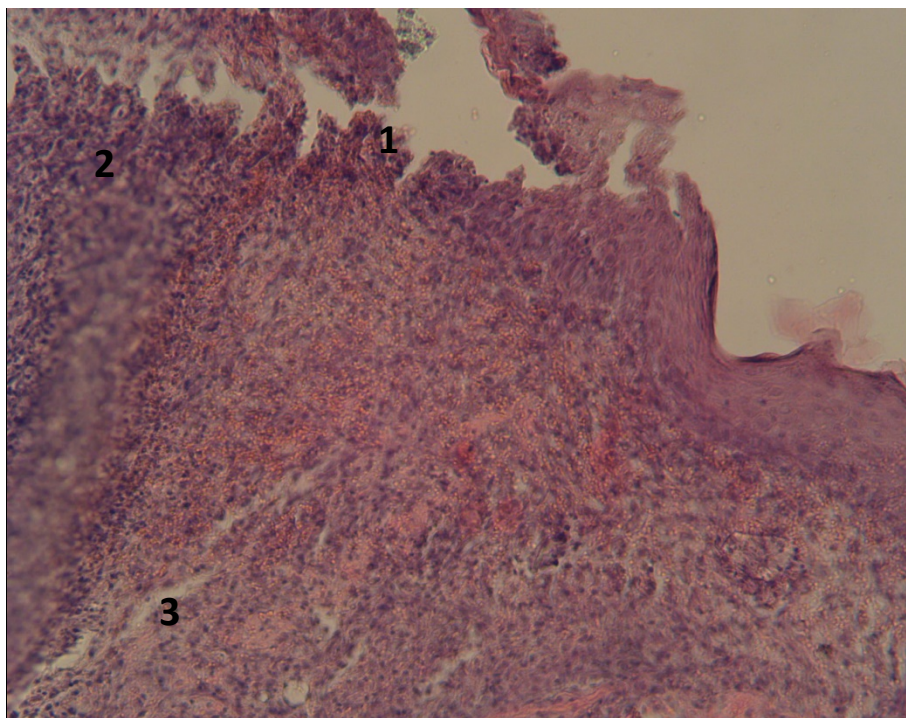


Рисунок 3.41 – Дефект шкіри щура молодого віку контрольної серії через 3 дні після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином.
Зб. х 400:1 – зона пошкодження; 2 – клітинна інфільтрація; 3 – стромальний набряк

Під час використання хітозанових мембран гістологічна картина з біоптату дефекту у тварин молодого віку майже ідентична показникам контрольної серії. Оксифільно забарвлена мембрана візуалізується на поверхні струпа. Під останнім відзначається лімфоцитарно-нейтрофільна інфільтрація. Порівняно з контролем відзначається зменшення периваскулярного та стромального набряків і відсутність порушення мікроциркуляції. Кількість макрофагів істотно збільшується у поверхневих шарах дефекту, що повинно привести до пришвидшення очищення рани (рис. 3.42).

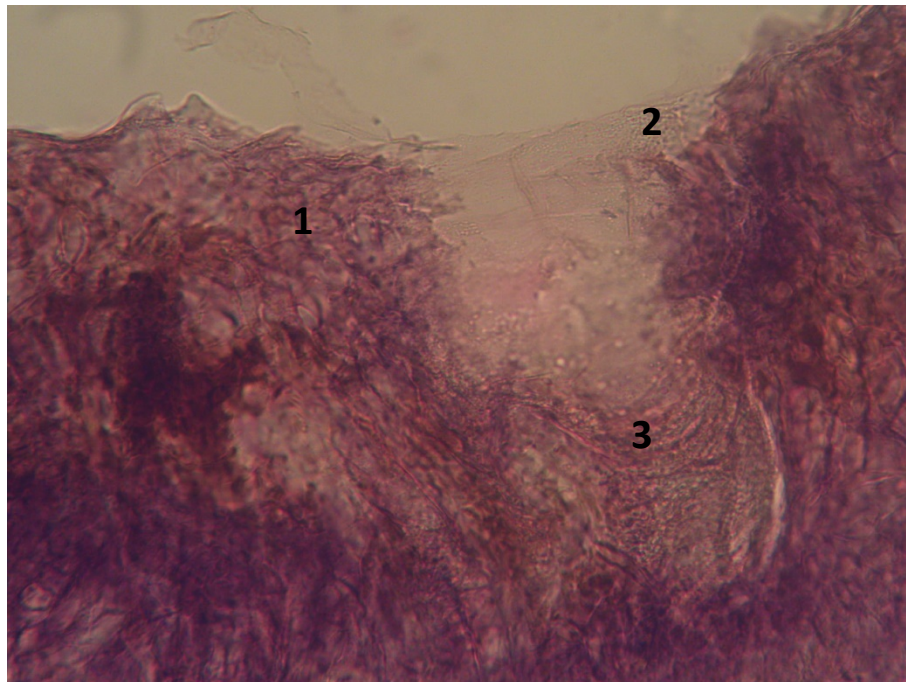


Рисунок 3.42 – Дефект шкіри щура молодого віку експериментальної серії через 3 дні після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Зб х 400: 1 – зона пошкодження; 2 – плівка хітозану; 3 – стромальний набряк

На сьому добу спостереження під струпом у тварин контрольної серії починає формуватися грануляційна тканина, багата на судини мікроциркуляторного русла та клітини гістіоцитарного ряду, зокрема фібробласти. При цьому зберігається порушення мікроциркуляції в глибоких шарах шкіри, а також периваскулярний та стромальний набряки. Під струпом відзначається наявність значної кількості макрофагів з ознаками фагоцитарної

активності. В цей термін спостереження відзначається початок епітелізації крайових відділів рани, проте площа епітелізованих ділянок є незначною.

Використання хітозанових мембран для корекції механічної травми приводить до зменшення проявів порушень мікроциркуляції, про що свідчить значне зменшення як стромального, так і периваскулярного набряків. Проте зберігається незначне повнокрів'я судин. Порівняно з контрольною серією грануляційна тканина є більш зрілою і характеризується зменшенням кількості судин та зростанням відсотка клітинних та волокнистих елементів. Кількість макрофагів відповідає показникам контрольної серії (рис. 3.43). Площа епітелізації по краях дефекту є значно більшою порівняно з контролем, що є свідченням стимулювального впливу продуктів деградації хітозану на клітини епітеліального ряду.

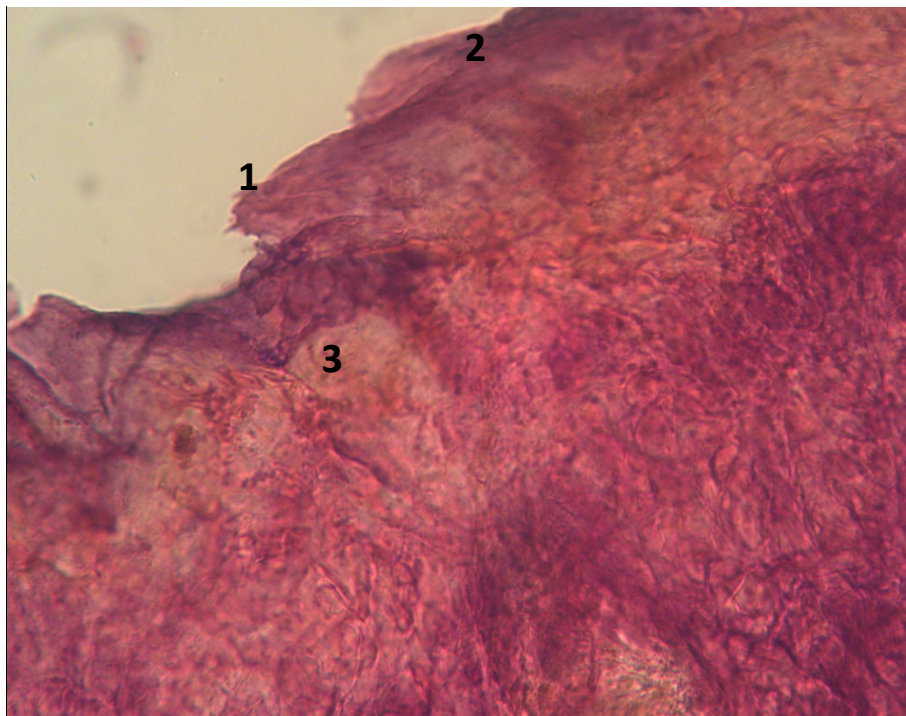


Рисунок 3.43 – Дефект шкіри щура молодого віку експериментальної серії через 7 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. х 400: 1 – плівка хітозану; 2 – зона епітелізації; 3- грануляційна тканина

На 14-ту добу спостереження у тварин контрольної серії струп зберігається лише у центральних ділянках дефекту. По периферії формується

ділянки епітелізації та спостерігаються залишки грануляційної тканини. Епідерміс дещо витончений, у дермі зберігаються незначні ознаки набряку та повнокров'я судин мікроциркуляторного русла. На межі епітелізованих ділянок та дерми відсутня клітинна інфільтрація. Грануляційна тканина трансформується в сполучну, проте орієнтація колагенових волокон є дещо хаотичною (рис. 3.44).

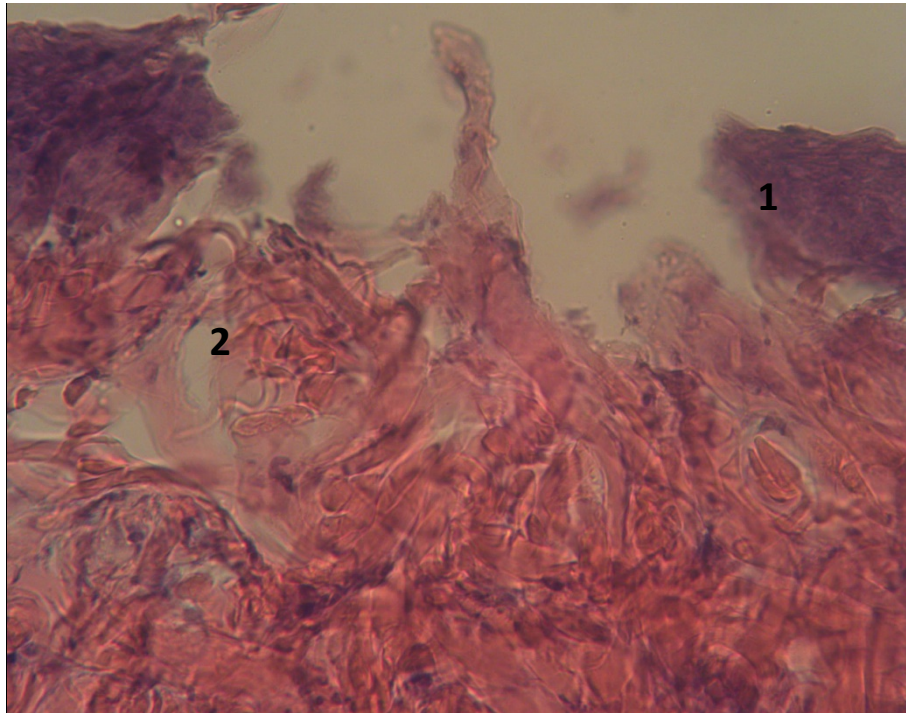


Рисунок 3.44 – Дефект шкіри щура молодого віку контрольної серії через 14 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б. х 400: 1 – зона епітелізації; 2 – грануляційна тканина

При використанні хітозану вся поверхня рани вкрита епітелієм, лише в центральних ділянках зберігаються вогнища грануляційної тканини. Набряк та клітинна інфільтрація на гістологічних препаратах відсутня, що свідчить про позитивну дію продуктів деградації хітозану на процеси регенерації. Під епідермісом відзначається формування сполучної тканини з паралельно орієнтованими волокнами колагену. Фібробласти мають проліферативний та секреторний фенотипи, про що свідчить наявність гранул та просвітлення їх

ядер. Новосформовані судини здебільшого середнього діаметра без ознак повнокров'я (рис. 3.45).

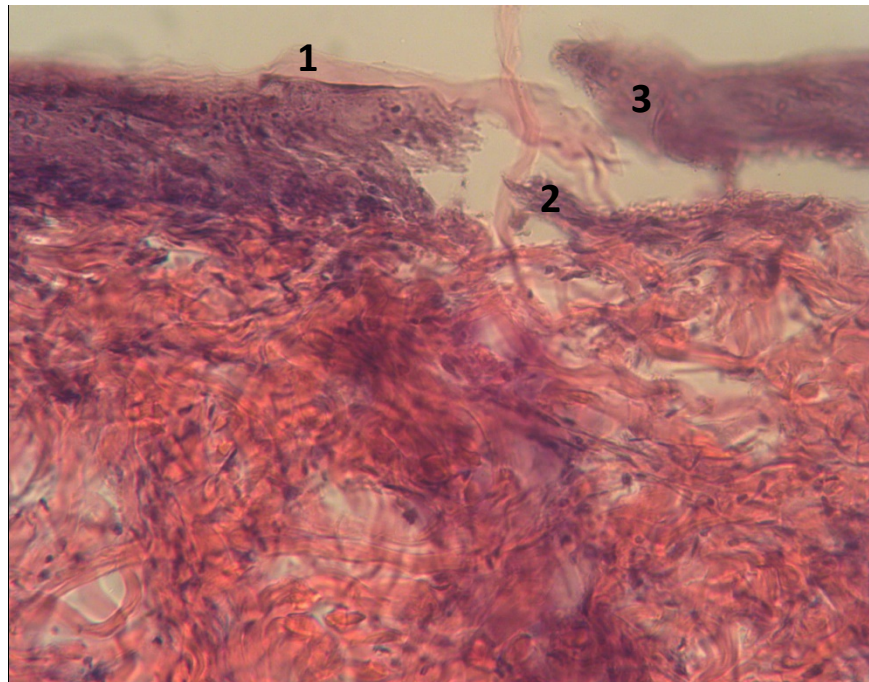


Рисунок 3.45 – Дефект шкіри щура молодого віку експериментальної серії через 14 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б. х 400: 1 – плівка хітозану; 2 – грануляційна тканина; 3- зона епітелізації

На 21-шу добу спостереження у тварин обох серій відзначається повна епітелізація ділянки травми та формування всіх шарів дерми з волосяними фолікулами та залозами. Ділянки набряку та порушень мікроциркуляції відсутні, епітелій звичної будови. При цьому у тварин контрольної серії без застосування хітозанових мембран на деяких препаратах відзначається формування рубцевої тканини. Використання експериментальних хітозанових мембран приводить до упорядкування напрямку волокон у новосформованих тканинах. При цьому відзначається зростання кількості судин мікроциркуляторного русла у тварин експериментальної серії (рис. 3.46).

Гістоморфометрія біоптатів шкіри тварин молодого віку контрольної серії свідчить про розвиток стромального набряку з першої доби спостереження.

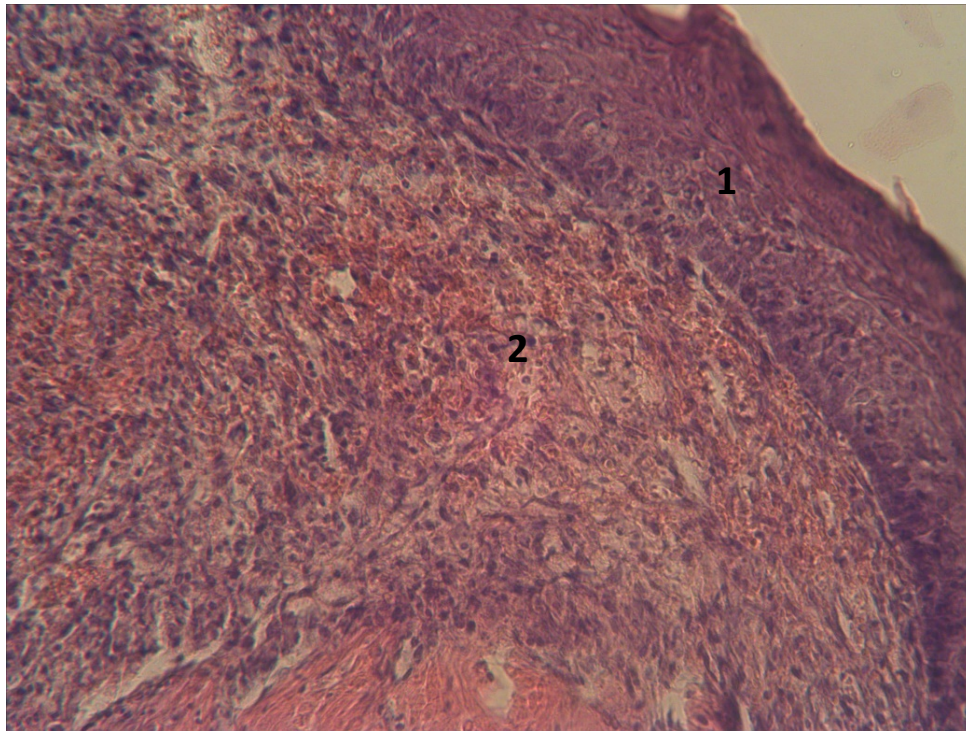


Рисунок 3.46 – Дефект шкіри щура молодого віку експериментальної серії через 21 день після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б. х 400: 1 – новоутворений епідерміс; 2 – дерма

Так, у зазначений термін відносна площа стромального набряку становить $(16,64 \pm 1,07) \%$, незначно зменшуючись через 3 дні спостереження. Вже через 7 днів після травми цей показник становить $(10,17 \pm 0,8) \%$, що свідчить про нормалізацію кровопостачання та відновлення мікроциркуляції. Через 14 днів відносна площа набряку становить лише $(5,62 \pm 0,69) \%$ і через 21-шу добу не виявляється на усіх препаратах.

Повнокров'я судин дерми приводить до зростання їх площі до $(7,48 \pm 0,99) \%$ через 1 добу після травми та до $(7,32 \pm 0,4) \%$ – 1 через 3 дні після формування дефекту. Поступово відбувається зменшення площі судин, що корелює з гістологічними даними щодо зменшення проявів судинної реакції шкіри. Через 21 день після травми відносна площа судин дерми становить $(5,93 \pm 0,4) \%$. Середній діаметр судин дерми також зростає через 1 добу після травми до $(24,11 \pm 1,7) \text{ мкм}$ і зменшується через 21 день спостереження до $(15,42 \pm 0,91) \text{ мкм}$. Утворення грануляційної тканини з 3-ї доби після травми

супроводжується її активною васкуляризацією. Відносна площа судин грануляційної тканини зростає з 3-ї до 14-ї доби з $(3,34 \pm 0,3)$ до $(15,09 \pm 1,06)$ %. Визрівання грануляційної тканини супроводжується зменшенням відносної площі судин на 21-шу добу спостереження до $(10,24 \pm 1,01)$ %. Середній діаметр судин грануляційної тканини коливається від $(10,03 \pm 0,92)$ мкм на 3-тю добу спостереження до $(14,91 \pm 0,95)$ мкм – через 21 день після травми.

Застосування хітозанових плівок для лікування пошкоджень шкіри у тварин молодого віку не приводить до достовірної зміни гістоморфометричних показників через 1 добу після травми. Проте вже через 3 дні спостереження відбувається достовірне зменшення відносної площі стромального набряку до $(14,01 \pm 0,5)$ % ($p = 0,0415$), через 7 днів – до $(7,10 \pm 0,68)$ % ($p = 0,0152$) і через 14 днів – до $(2,91 \pm 0,31)$ % ($p = 0,0050$). Як і у контрольній групі, при застосуванні хітозану стромальний набряк на 21-шу добу в гістологічних препаратах відсутній.

Відносна площа судин дерми достовірно зменшується під час застосування хітозанових мембран на 3-тю та 7-му доби після травми. Зазначений показник при цьому становить відповідно $(6,12 \pm 0,36)$ % ($p = 0,0499$) та $(5,35 \pm 0,32)$ % ($p = 0,0490$). Необхідно відмітити, що середній діаметр судин дерми достовірно менший за контроль лише на 3-тю добу спостереження і становить $(17,77 \pm 0,85)$ мкм ($p = 0,0493$). У тварин експериментальної серії відзначається ранній початок формування грануляційної тканини, при цьому відносна площа її судин перевищує контроль через 3 та 7 днів спостереження відповідно на 23,91 % ($p = 0,0352$) та 17,87 % ($p = 0,0463$). Більш раннє визрівання грануляційної тканини супроводжується зменшенням відносної площі судин на 14-ту та 21-шу доби спостереження, хоча різниця з контролем є недостовірною. Середній діаметр судин дерми не достовірно відрізняється від контролю майже в усі терміни спостереження (рис. 3.47).

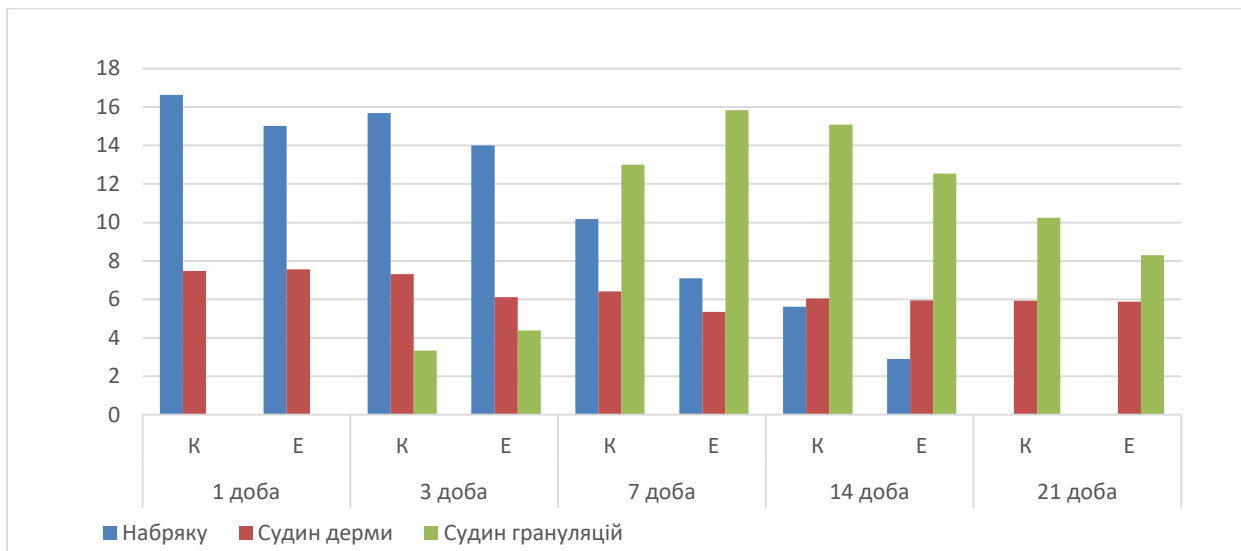


Рисунок 3.47 – Співвідношення морфометричних показників шкіри в ділянці дефекту тварин молодого віку контрольної та експериментальної серій

На гістологічних препаратах біоптату шкіри тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій через 3 доби після травми спостерігається відсутність епідермісу, що є наслідком механічної травми. У дермі та підшкірно-жировій клітковині спостерігається набряк, що є свідченням зростання проникності судин як рефлекторної реакції на травму (рис. 3.48). Трапляється периваскулярний набряк та повнокров'я судин мікроциркуляторного русла, місцями спостерігається стаз еритроцитів. У всіх збережених шарах шкіри виявляється дифузна змішана нейтрофільно-лімфоцитарна інфільтрація, що більш виражена біля поверхні дефекту. На поверхні травмованих шарів шкіри з третьої доби виявляються некротизовані ділянки шкіри, місцями відмежовані від здорових тканин нейтрофільним валиком.

Відмінністю гістологічної картини препаратів тварин експериментальної серії на 3-тю добу спостереження є поява макрофагальних елементів та зменшення нейтрофільно-лімфоцитарної інфільтрації. У поверхневих шарах шкіри відзначається зменшення тканинного набряку, що, можливо, є наслідком високих сорбційних властивостей хітозанових мембран (рис. 3.49).

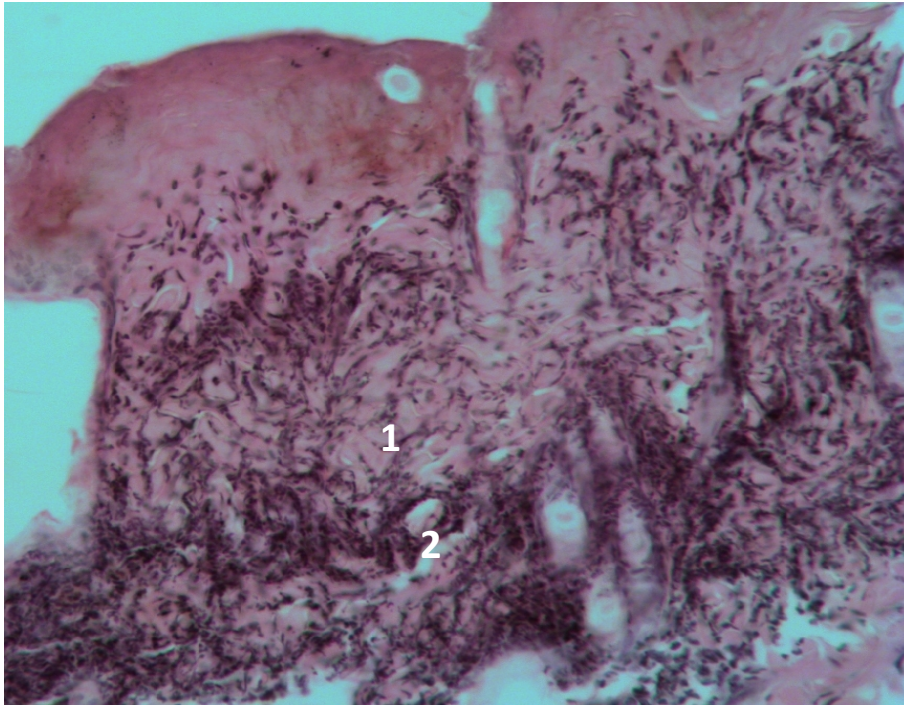


Рисунок 3.48 – Дефект шкіри щура зрілого віку контрольної серії через 3 дні після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x400: 1 – вогнище некрозу; 2 – нейтрофільна інфільтрація

Через 7 днів після травми на гістологічних препаратах біоптатів поверхні дефекту тварин контрольної серії відзначається зменшення тканинного та периваскулярного набряку, що є свідченням покращення процесів геодинаміки ушкодженої ділянки шкіри. Зменшується кількість повнокрівних судин та стазів у капілярах мікроциркуляторного русла. У глибоких шарах шкіри зменшується нейтрофільно-лімфоцитарна інфільтрація, яка залишається вираженою біля поверхні дефекту. Відзначається поява значної кількості макрофагів, більшість з яких заповнена детритом. Некротизовані ділянки шкіри відмежовуються від здорових прошарком нейтрофілів. На поверхні дефекту з'являється грануляційна тканина, що заміщує некротизовані ділянки. У периферичній зоні травмованої ділянки спостерігається поява поодиноких острівців епітелізації. Епітеліоцити характеризуються наявністю ознак проліферативної активності у вигляді збільшення розмірів ядер та їх просвітлення.

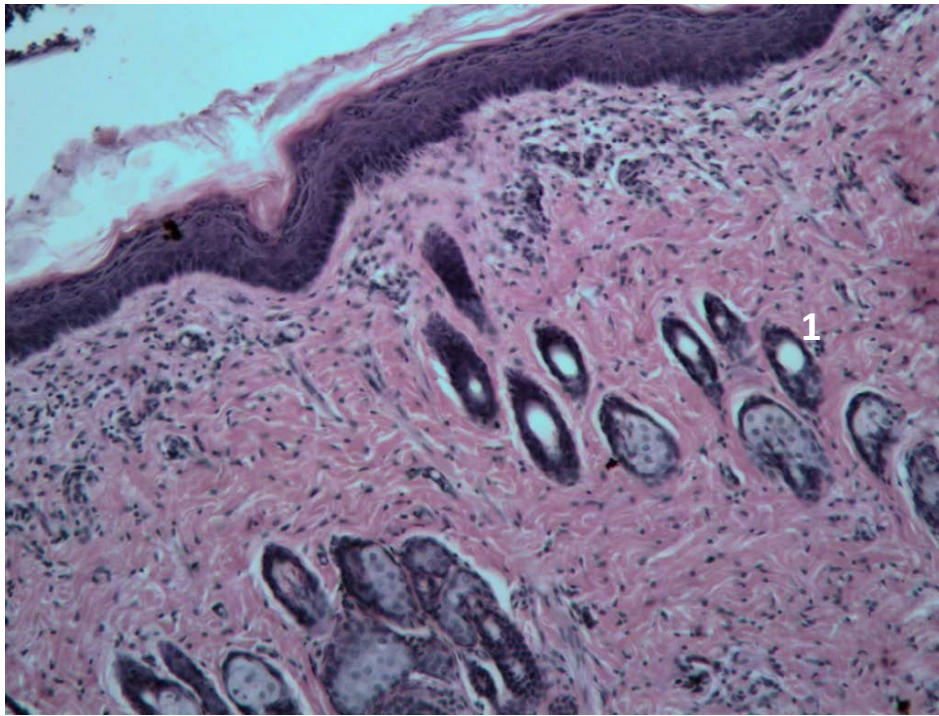


Рисунок 3.49 – Дефект шкіри щура зрілого віку експериментальної серії через 3 дні після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Зб. х 200:1 – змішаноклітинна інфільтрація

Під час застосування хітозанової мембрани для місцевого лікування механічного пошкодження шкіри через 7 днів спостереження відзначається значне зменшення набряку, особливо в поверхневих шарах шкіри, що є наслідком покращання гемодинаміки, з одного боку, та високих сорбуючих властивостей матеріалу – з іншого. У глибоких ділянках шкіри зникають явища нейтрофільно-лімфоцитарної інфільтрації, що змінюється на макрофагально-гістіоцитарну, особливо у поверхневих ділянках (рис. 3.50). Макрофаги здебільшого з ознаками активного фагоцитозу, що приводить до зменшення некротизованих ділянок на поверхні рани. На травмованій поверхні відзначається розвиток грануляційної тканини з великою кількістю фібробластів та судин різного діаметра. У периферійній зоні дефекту відзначається поява поодиноких острівців епітелізації.

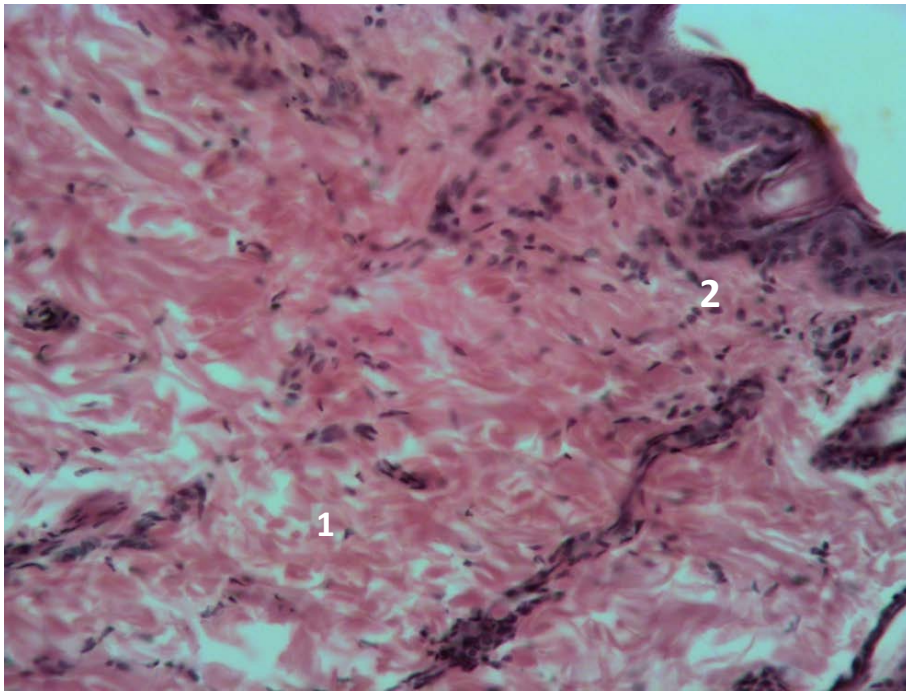


Рисунок 3.50 – Дефект шкіри щура зрілого віку експериментальної серії через 7 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. х 200: 1 – макрофагально-гістіоцитарна інфільтрація; 2 – набряк

На 14-ту добу після травми в біоптаті тварин контрольної серії відмічається значне зменшення тканинного та периваскулярного набряку, ознаки яких спостерігаються лише на окремих препаратах. Відбувається майже повна відсутність нейтрофільно-лімфоцитарної реакції та переважання макрофаго-гістіоцитарного компонента. Нормалізується васкуляризація всіх шарів шкіри, що характеризується відсутністю стазів та повнокров'я судин малого та великого калібру. Поява великої кількості макрофагів призвела до зменшення зони некрозу в поверхневих шарах дефекту та розвитку значної кількості грануляційної тканини з добре вираженим судинним компонентом. У грануляційній тканині відзначається значна кількість фібробластів з ознаками активної секреції, що приводить до утворення добре вираженої сітки сполучної тканини. При цьому в периферичних відділах дефекту відзначається прискорена епітелізація рани, джерелом якої слугують клітини неушкоджених ділянок шкіри (рис. 3.51).

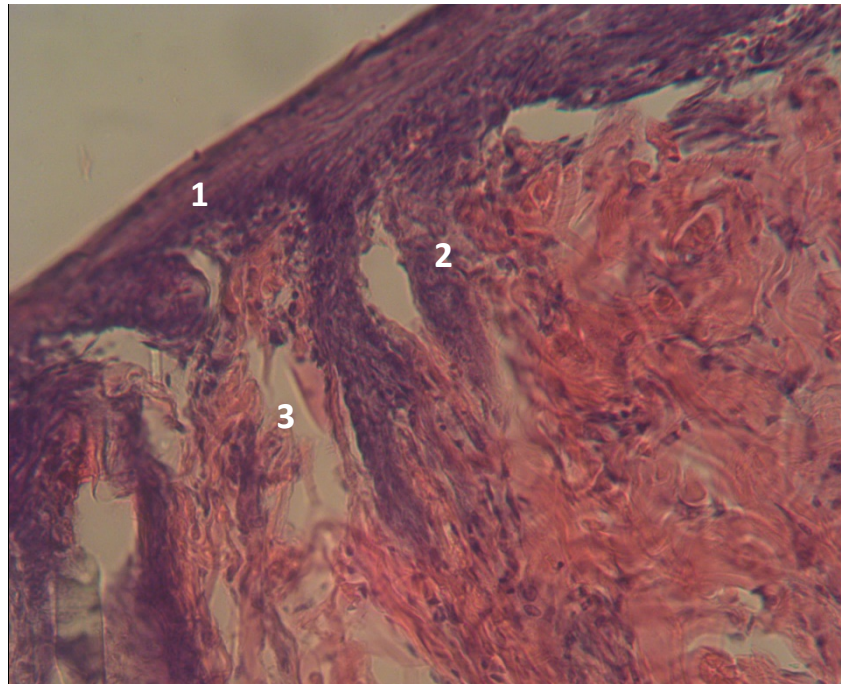


Рисунок 3.51 – Дефект шкіри щура зрілого віку контрольної серії через 14 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б. x 200: 1 –зона епітелізації; 2 – грануляційна тканина; 3 – набряк

У біоптатах дефекту шкіри тварин експериментальної серії через 14 днів відзначається відсутність запальної інфільтрації в усіх шарах. Ознаки набряку зникають, повністю нормалізується кровопостачання усіх шарів шкіри. У поверхневих ділянках дефекту візуалізується новоутворена сітка капілярів. Відсоток макрофагів значно зменшується порівняно як із контрольною серією, так і з попереднім терміном спостереження. Площа грануляційної тканини зменшується за рахунок епітелізації центральних ділянок дефекту (рис. 3.52). Під шаром епітелію та грануляцій спостерігається сформована сітка сполучної тканини з чисельними фібробластами.

Через 21 день після завдання механічної травми у тварин контрольної серії відзначається майже повна епітелізація поверхні дефекту. Місцями спостерігаються залишки грануляційної тканини, особливо в центральних відділах рани. Під поверхнею епітелію візуалізується сполучна тканина зі значним вмістом грубоволокнистого компонента. У глибоких шарах відсутні явища набряку та запальної інфільтрації. При цьому необхідно відзначити

порушення звичної будови шкіри за рахунок розвитку поодиноких рубцевих змін.

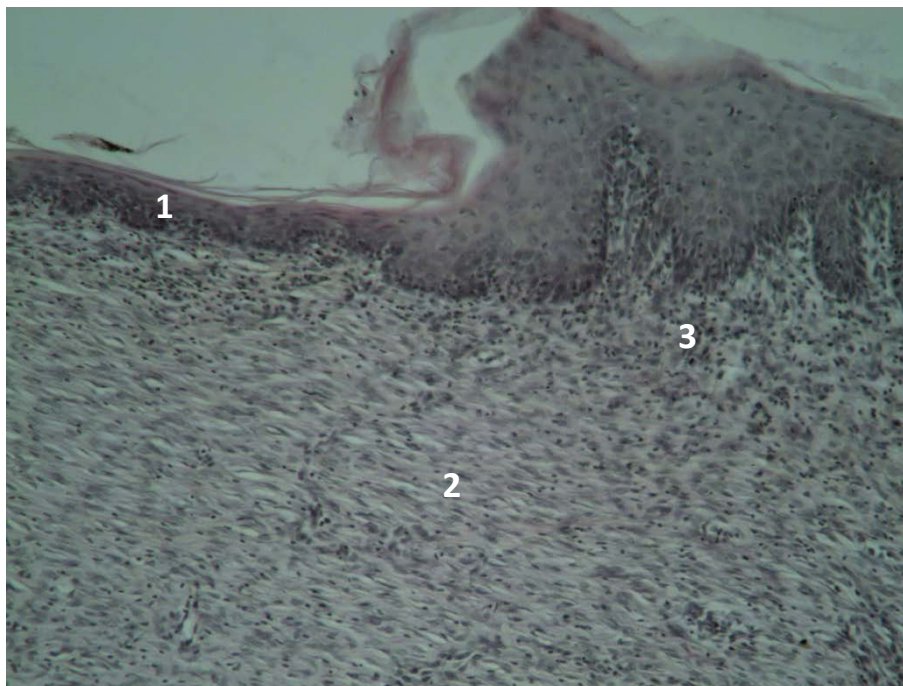


Рисунок 3.52 – Дефект шкіри щура зрілого віку експериментальної серії через 14 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 36 x 200: 1 – ділянки епітелізації; 2 – сполучна тканина; 3 – грануляційна тканина

Під час застосування хітозанової мембрани для лікування дефекту шкіри через 21 день після завдання травми відзначається повна епітелізація поверхні рани. На відміну від контрольної серії в біоптатах відсутня грануляційна тканина. У новоутвореній сполучній тканині значно зменшується вміст грубоволокнистого компонента (рис. 3.53). Загалом на 21-шу добу після травми відбувається повне відновлення втрачених шарів шкіри та зменшення утворення сполучнотканинних рубцевих змін.

Гістоморфометричні показники тварин контрольної серії зрілого віку також свідчать про розвиток стромального набряку та активну судинну реакцію. Відносна площа стромального набряку через 1 добу становить $(15,02 \pm 1,38) \%$, зростаючи до $(17,36 \pm 0,98) \%$ через 3 дні після травми. Проте вже через 14 днів цей показник зменшується до $(5,93 \pm 0,49) \%$. Відносна площа судин дерми змінюється меншою мірою порівняно з тваринами молодого віку,

хоча даний показник коливається від $(7,84 \pm 0,92)$ % у перший день спостереження до $(6,02 \pm 0,46)$ % – через 21 добу після травми. Повнокров'я судин дерми приводить до зростання їх діаметра до $(32,12 \pm 1,61)$ мкм через 1 добу після травми з поступовим зменшенням даного показника до 21-ї доби. У цей термін діаметр судин дерми становить $(17,77 \pm 1,04)$ мкм.

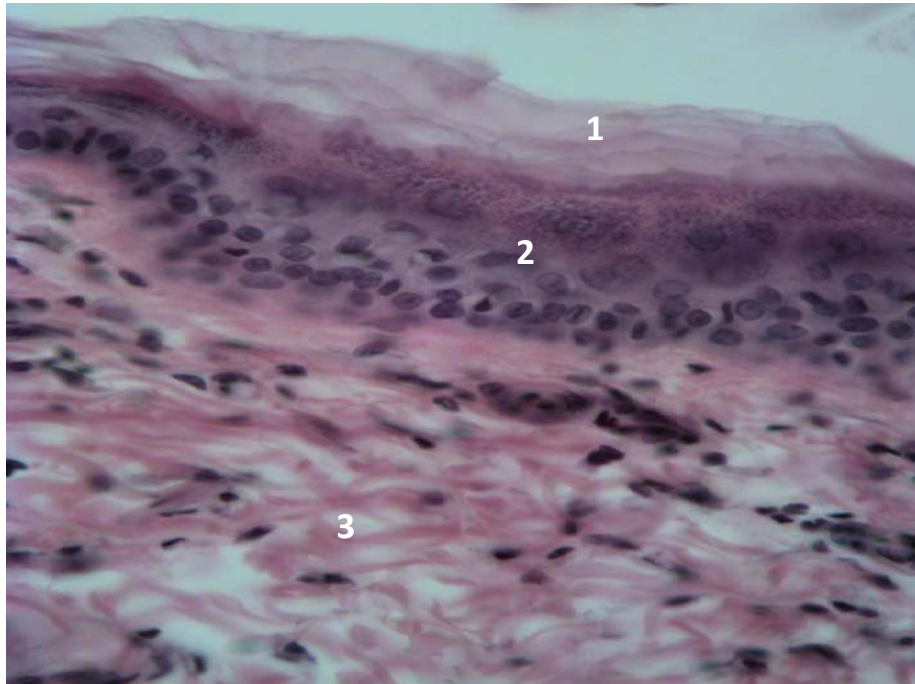


Рисунок 3.53 – Дефект шкіри щура зрілого віку експериментальної серії через 21 день після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 36 x 400: 1 – хітозанова плівка; 2 – епідерміс; 3 - дерма

Утворення грануляційної тканини супроводжується ростом судин, відносна площа яких через 3 дні становить $(3,58 \pm 0,39)$ %, зростаючи до $(16,04 \pm 0,72)$ % через 14 днів. Визрівання тканини приводить до зменшення відносної площі судин грануляційної тканин на 21-шу добу спостереження до $(12,60 \pm 0,97)$ %. Середній діаметр судин грануляційної тканин зростає з 3-ї до 21-ї доби спостереження з $(12,76 \pm 0,52)$ до $(17,05 \pm 0,82)$ мкм відповідно.

Як і у попередній віковій групі при використанні хітозанових мембран відбувається зменшення відносної площі стромального набряку. Проте достовірна різниця спостерігається лише у терміни 3 та 7 днів після травми та становить $(13,07 \pm 1,23)$ % ($p = 0,0213$) та $(6,7 \pm 0,61)$ % ($p = 0,0478$) відповідно.

Показник відносної площі судин дерми достовірно не відрізняється від контролю в усі терміни спостереження та зменшується з $(7,54 \pm 0,51) \%$ ($p = 0,7813$) у перший день до $(5,79 \pm 0,48) \%$ ($p = 0,7365$) через 21 добу після травми. При цьому використання хітозану для лікування пошкоджень шкіри приводить до достовірного зменшення середнього діаметра судин дерми на 7-му добу спостереження до $(17,59 \pm 0,85) \%$ ($p = 0,0487$). Відносна площа та середній діаметр судин грануляційної тканини достовірно перевищує контроль на 26,34 % ($p = 0,0472$) та 14,76 % ($p = 0,0252$) лише на 3-тю добу після травми, що свідчить про ранній початок утворення грануляційної тканини. В інші терміни спостереження показники грануляційної тканини недостовірно відрізняються від контролю (рис. 3.54).

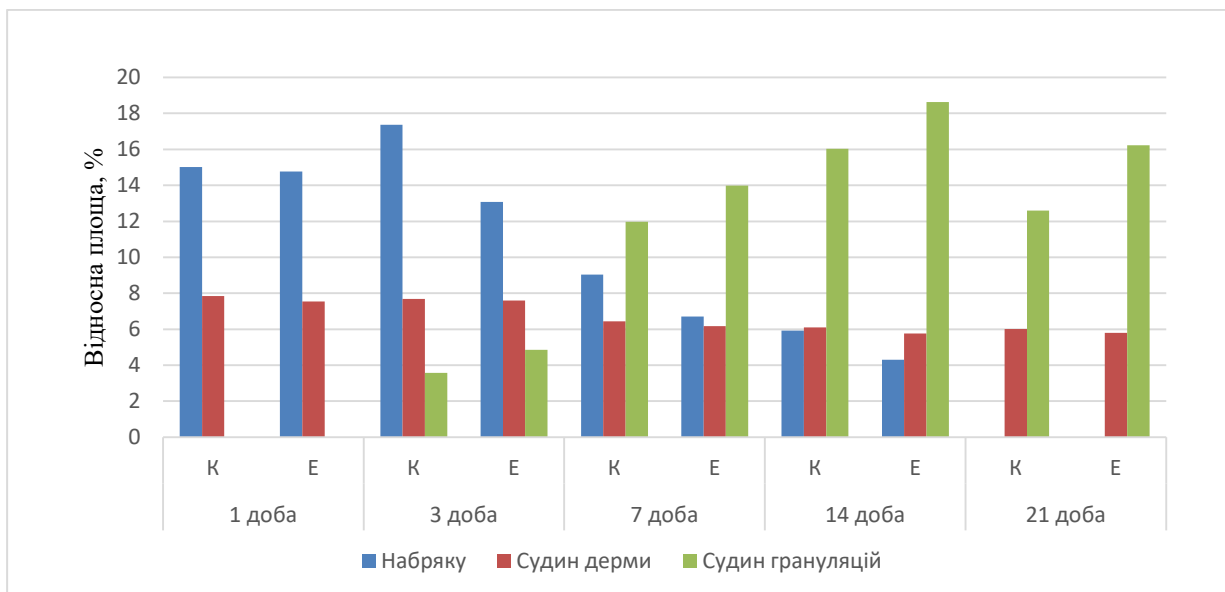


Рисунок 3.54 – Співвідношення морфометричних показників шкіри в ділянці рани у тварин зрілого віку контрольної та експериментальної серій

На 3-тю добу спостереження у тварин контрольної серії старечого віку на поверхні травми формується струп, відмежований від неушкоджених ділянок вираженою лімфоцитарно-нейтрофільною інфільтрацією. Механічна травма не приводить до змін будови залоз шкіри, проте навколо них формується лімфоїдна інфільтрація. У тварин старечого віку на відміну від попередніх вікових груп різко виражені судинні прояви у вигляді повнокрів'я та тромбозу

просвіту судин, а також вираженого набряку епідермісу та дерми. У гістологічних препаратах тварин старечого віку майже відсутні макрофаги, що, можливо, є наслідком порушення міжклітинних кооперацій.

Використання хітозанових мембран приводить до незначного зменшення набряку тканин, що, можливо, є наслідком сорбувальної дії препарату. Проте не відзначається зменшення інфільтрації, а також розладів судин мікроциркуляторного русла. На відміну від контролю кількість макрофагів зростає, проте їх фагоцитарна активність є незначною (рис. 3.55).

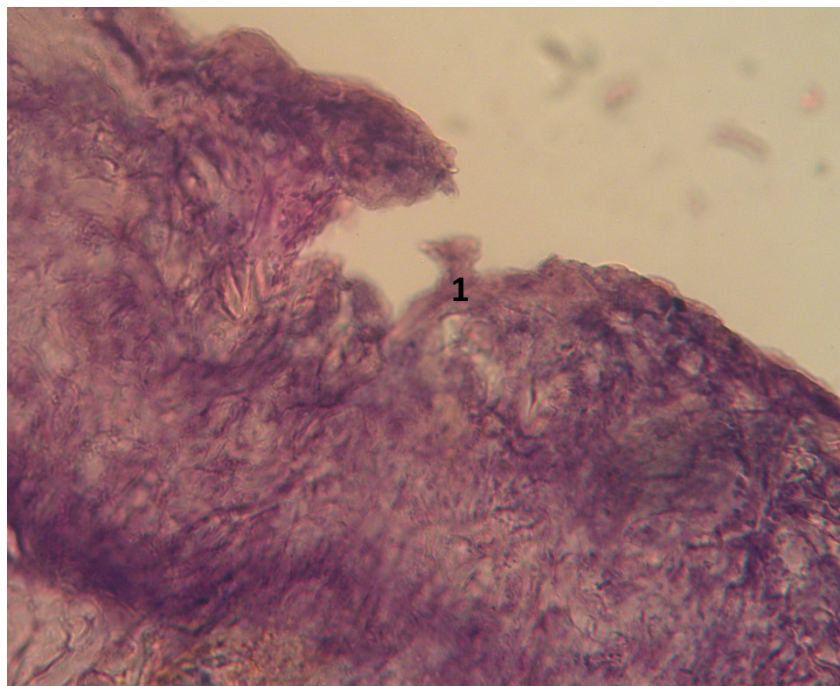


Рисунок 3.55 – Дефект шкіри щура старечого віку експериментальної серії через 3 дні після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б x 400: 1 – зона ушкодження

У тварин старечого віку контрольної серії на 7-му добу спостереження на відміну від попередніх вікових груп не відзначається початок епітелізації. Під струпом формується грануляційна тканина з хаотично спрямованих сполучнотканинних волокон та клітин фібробластичного ряду з низькою проліферативною активністю. На межі з неушкодженими ділянками зберігається лімфоцитарно-нейтрофільна інфільтрація. Набряк шкіри

порівняно з попереднім терміном дещо зменшується, проте зберігаються розлади мікроциркуляції у вигляді повнокров'я судин та поодиноких крововиливів (рис. 3.56).

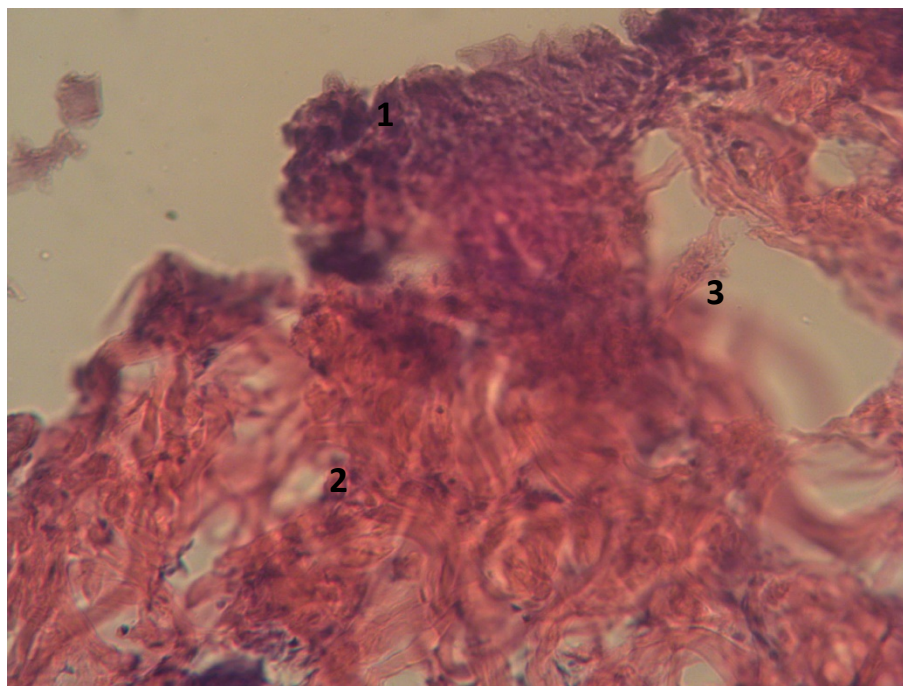


Рисунок 3.56 – Дефект шкіри щура старечого віку контрольної серії через 7 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 36 x 400: 1 – новоутворений епітелій; 2 – грануляційна тканина; 3 – набряк

Використання хітозанових мембран приводить до стимуляції процесів крайової епітелізації, проте площа новоутвореного епідермісу є незначною порівняно з попередніми віковими групами. Грануляційна тканина, що формується під струпом, є незрілою, зі значною кількістю дрібних судин та клітин фібробластичного ряду. Кількість секреторних гранул у цитоплазмі фібробластів зростає порівняно з контролем (рис. 3.57).

14-та доба експерименту у тварин старечого віку характеризується початком активної епітелізації поверхні рани. Проте в центральних ділянках дефекту зберігаються ділянки струпу та грануляційної тканини. Зберігається незначний периваскулярний і стромальний набряк та поодинокі вогнища клітинної інфільтрації. Під епідермісом грануляційна тканина

трансформується у зрілу сполучну тканину зі значним грубоволокнистим компонентом. Розлади мікроциркуляції залишаються у вигляді незначного повнокрів'я судин. Ділянки крововиливів та тромбозів відсутні.

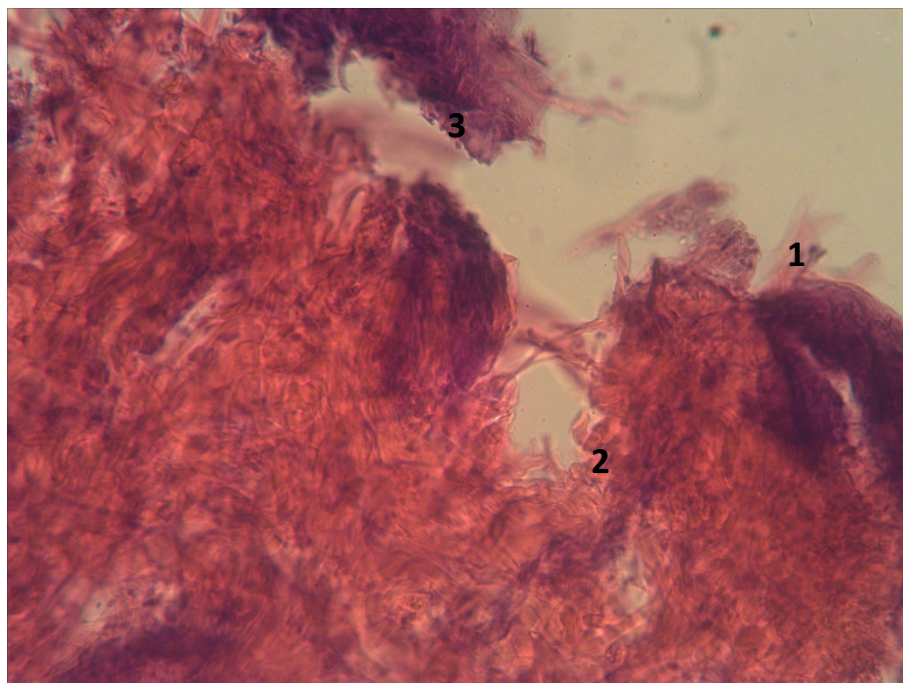


Рисунок 3.57 – Дефект шкіри щура старечого віку експериментальної серії через 7 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином.

36 x 400: 1 – хітозанова плівка; 2 – грануляційна тканина; 3 – набряк

У тварин старечого віку під час використання хітозанових мембран на 14-ту добу після травми продовжується епітелізації поверхні дефекту, проте центральні відділи ран представлені сформованою грануляційною тканиною. Незважаючи на застосування хітозану, відзначається значна частка грубоволокнистого компонента. Під епідермісом зберігаються незначні вогнища стромального набряку. Розлади мікроциркуляції відзначаються лише в поодиноких гістологічних препаратах (рис. 3.58).

На 21-шу добу спостереження в контрольній серії тварин відбувається повна епітелізація поверхні дефекту. Проте спостерігається витончення епідермісу та наявність значного грубоволокнистого компонента в усіх шарах дерми. В деяких препаратах візуалізується формування рубцевої тканини, що є особливістю регенерації шкіри у тварин старечого віку. Залози шкіри та

волосяні фолікули звичної будови, проте їх щільність менша, ніж у тварин інших вікових груп. Розлади мікроциркуляції та набряк відсутні.

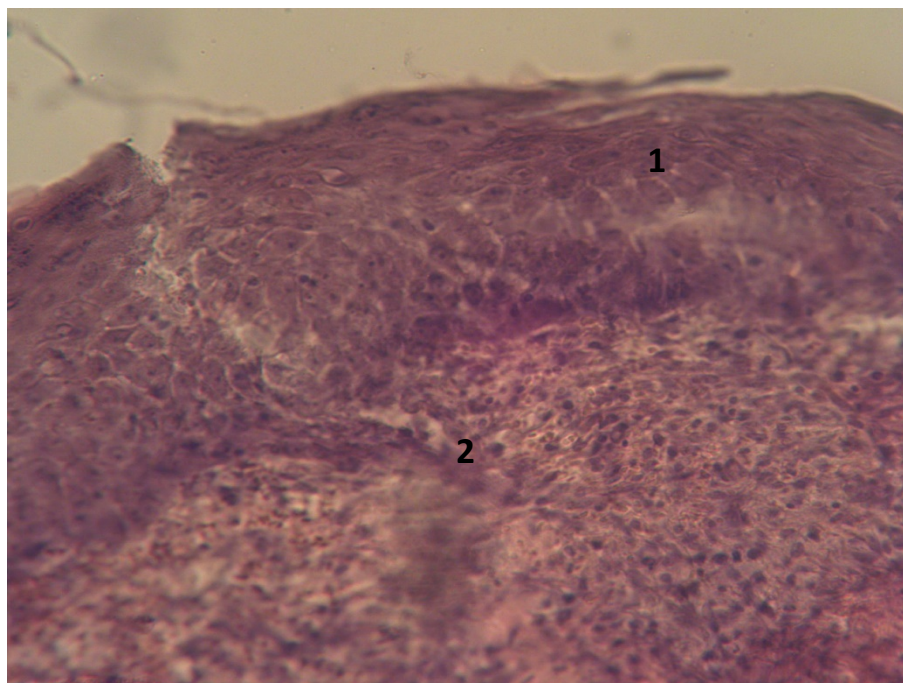


Рисунок 3.58 – Дефект шкіри щура старечого віку експериментальної серії через 14 днів після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б x 400: 1 – епітелізована ділянка; 2 – залишки грануляційної тканини

Незважаючи на застосування хітозанових мембран, у тварин старечого віку відзначається наявність грубоволокнистого компонента в шарах дерми, а також розвиток рубцевих змін шкіри (рис. 3.59). Необхідно зазначити, що площа рубців є меншою, ніж у тварин контрольної серії.

Характерною особливістю цієї вікової групи контрольної серії є те, що навіть на 21-шу добу спостереження відносна площа стромального набряку становить $(4,39 \pm 0,81) \%$. Судинна реакція шарів шкіри підтверджується зростанням відносної площі судин дерми та їх діаметру у першу добу до $(8,41 \pm 0,40) \%$ та $(34,85 \pm 1,10) \text{ мкм}$. У подальшому відбувається поступове зменшення досліджуваних показників, досягаючи $(6,23 \pm 0,77) \%$ та $(22,57 \pm 1,12) \text{ мкм}$ через 21 день після травми.

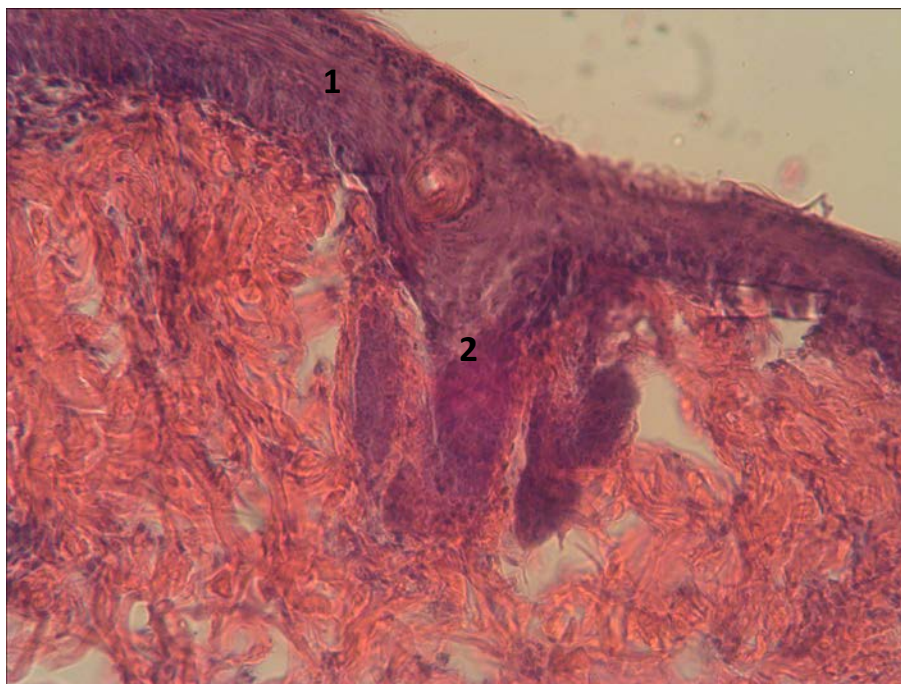


Рисунок 3.59 – Дефект шкіри щура старечого віку експериментальної серії через 21 день після завдання травми. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б x 400: 1 – епітелізована ділянка; 2 – рубцеві зміни

Відносна площа судин грануляційної тканини через 3 доби є найменшою порівняно з тваринами інших вікових груп і становить $(2,07 \pm 0,37)$ %. У подальшому відбувається ріст цього показника, який становить відповідно термінів спостереження $(8,62 \pm 0,71)$, $(11,84 \pm 0,86)$ та $(10,84 \pm 0,98)$ %. Середній діаметр судин грануляційної тканини зростає з $(10,03 \pm 0,32)$ мкм на 3-й день спостереження до $(18,74 \pm 1,14)$ мкм – на 21-шу добу після травми.

Найбільш виражені зміни гістоморфометричних показників експериментальної серії спостерігаються у тварин старечого віку, що свідчить про зменшення регенераторного потенціалу з віком.

Використання хітозанової мембрани у тварин старечого віку не приводить до достовірної зміни більшості показників, що свідчить про зменшення регенераторного потенціалу з віком. Так, відносна площа стромального набряку становить $(17,23 \pm 0,73)$ % ($p = 0,1996$) – через 1 добу після травми і зростає до $(18,33 \pm 0,90)$ % ($p = 0,2342$) через 3 дні спостереження. Лише на 7-му, 14-ту та 21-шу доби після травми цей показник

достовірно зменшується порівняно з контролем на 20,83 % ($p = 0,0086$), 22,14 % ($p = 0,0443$) та 52,85 % ($p = 0,0402$) (рис. 3.60).

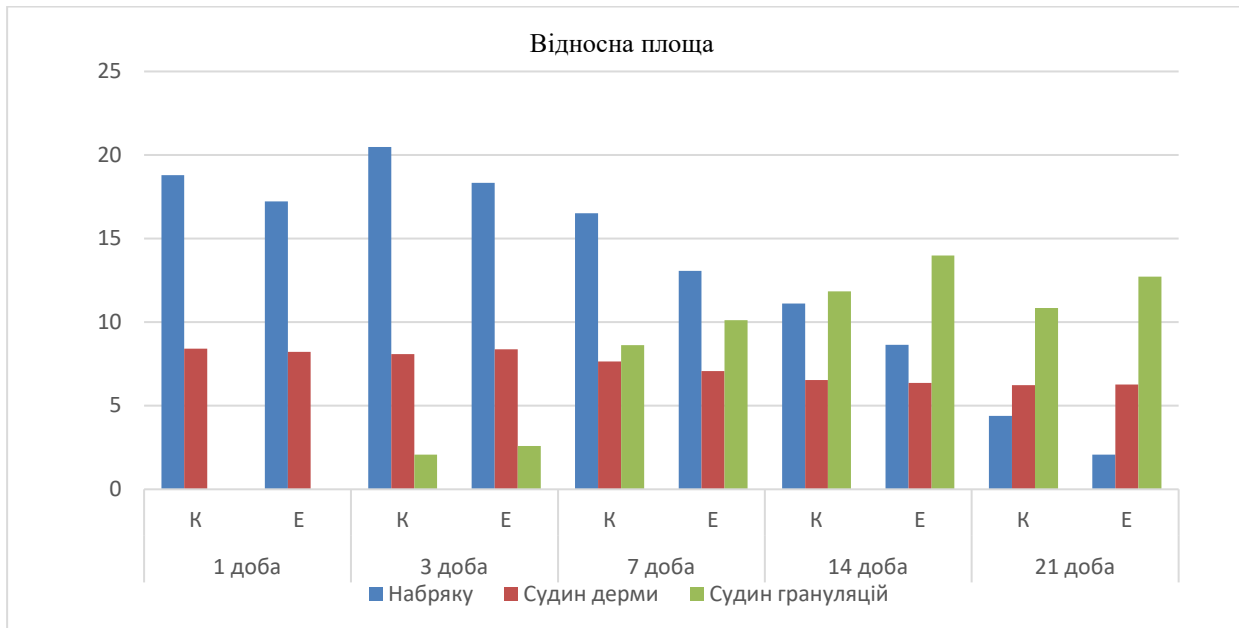


Рисунок 3.60 – Співвідношення морфометричних показників шкіри у ділянці дефекту у тварин старечого віку контрольної та експериментальної серій

3.5 Вивчення мікробіологічних показників поверхні рани ділянки шкіри у тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серії

Після формування на поверхні міжлопаткової ділянки механічної травми було проведене мікробіологічне дослідження для моніторингу мікробної контамінації поверхні рани під час процесу регенерації. Матеріал для посіву забирали на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після нанесення дефекту.

Через 1 добу після завдання дефекту у змивах зі шкіри тварин молодого віку спостерігаються лише умовно-патогенні мікроорганізми: *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus salivarius* кількістю ≤ 50 та ≤ 70 КУО/мл змиву відповідно. На поверхні дефекту патогенні бактерії типу дріжджоподібних грибів роду *Candida*, *Bacillus cereus* та *Aspergillus pp.* у цей термін спостереження відсутні. Така мікробіологічна картина характерна для неушкодженої шкіри лабораторних тварин.

Починаючи з 3-ї доби спостереження поверхня рани заселяється умовно-патогенними мікроорганізмами, характерними для тварин даного виду (табл. 3.1). Так, через 3 доби після моделювання механічної травми в змивах із рани щурів молодого віку спостерігається наявність як умовно-патогенних *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus salivarius*, так і патогенних мікроорганізмів: грибів роду *Candida*, *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* Кількість останніх у цей термін спостереження становить $\leq 10^2$, $\leq 10^3$ та $\leq 10^3$ КУО/мл змиву відповідно. При цьому необхідно зазначити, що кількість стафілококів та стрептококів дорівнює $\leq 10^2$ КУО/мл змиву, що достовірно відрізняється та істотно перевищує аналогічні показники попереднього терміну спостереження. Така мікробіологічна картина в змивах із поверхні рани лабораторних тварин молодого віку свідчить про розвиток бактеріального запалення вже на 3-тю добу спостереження.

Через 7 та 14 днів після моделювання механічної травми, мікробіологічна картина змивів з рани шкіри тварин контрольної серії істотно не змінюється. Умовно-патогенна мікрофлора представлена *Staphylococcus aureus* та

Streptococcus salivarius кількістю $\leq 10^2$ та $\leq 10^3$ КУО/мл змиву на 7-му добу та $\leq 10^2$ відповідно на 14-ту добу спостереження. Кількість грибів також змінюється незначно та становить $\leq 10^3$ КУО/мл змиву для *Candida spp.* та $\leq 10^2$ – для *Aspergillus pp.* відповідно.

Таким чином, можемо зауважити, що бактеріальне запалення на поверхні рани шкіри лабораторних тварин молодого віку контрольної серії розвивається через 3 доби після моделювання механічного дефекту та прогресує до 14-ї доби спостереження і лише на 21-шу добу рівень контамінації умовно-патогенними мікроорганізмами регресує до рівня змивів з нормальної шкіри. Тобто кількість стафілококів та стрептококів в останній термін спостереження дорівнює ≤ 50 та ≤ 90 КУО/мл змиву відповідно. При цьому кількість патогенних грибів роду *Candida spp.* та *Aspergillus spp.* достовірно зменшується порівняно з попереднім терміном спостереження, становлячи при цьому ≤ 50 та ≤ 80 КУО/мл змиву відповідно. Кількісний показник, що відповідає мікроорганізмам типу *Bacillus cereus* становлячи $\leq 10^2$ КУО/мл, залишається на високому рівні й на 21-шу добу спостереження.

Таблиця 3.1 – Кількісний та якісний склад мікрофлори рани шкіри щурів молодого віку контрольної серії

Назва мікроорганізму	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
кількість КУО/мл змиву з тампона					
<i>Staphylococcus spp.</i>	≤ 50	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	≤ 50
<i>Streptococcus spp.</i>	≤ 70	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$	≤ 90
<i>Candida spp.</i>	0	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	≤ 50
<i>Bacillus cereus</i>	0	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$
<i>Aspergillus spp.</i>	0	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	≤ 80

Застосування експериментальних хітозанових покриттів приводить до незначних, проте достовірних змін мікробіологічної картини у тварин молодого віку вже з 1-ї доби спостереження. Так, кількість умовно-патогенних *Streptococcus salivarius* порівняно з контролем зменшується з ≤ 50 до ≤ 40 КУО/мл змиву.

Більш виражений контраст між контрольними та експериментальними показниками як наслідок антибактеріальних властивостей хітозанових плівок відзначається з 3-ї доби спостереження. Кількість умовно-патогенних *Staphylococcus aureus* вже через 3 доби застосування становить лише ≤ 80 КУО/мл змиву. Кількість грибів роду *Candida* порівняно з контролем істотно зменшалася до ≤ 60 КУО/мл, а *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* у тварин експериментальної серії зовсім відсутні. Тобто застосування хітозанових плівок приводить до зміцнення антибактеріального бар'єра рани тварин експериментальної серії, адже відбувається достовірне зменшення кількості всіх без винятку мікроорганізмів, як порівняно з попереднім терміном спостереження, так і з аналогічними показниками контролю.

Виходячи з даних, наведені у таблиці 3.2, необхідно зауважити, що застосування експериментальних хітозанових плівок у тварин молодого віку після моделювання механічної травми шкіри приводить до значного зменшення бактеріальної контамінації в усі терміни спостереження. Вже на 7-му добу спостереження в рані тварин експериментальної серії з патогенних мікроорганізмів представлені лише дріжджоподібні гриби роду *Candida* кількістю ≤ 40 КУО/мл змиву. А показники умовно-патогенної мікрофлори відновлюються до рівня неушкодженої шкіри.

На 14-ту та 21-шу доби спостереження в експериментальній серії тварин молодого віку процеси регенерації переходять у завершальні етапи за умови відсутності бактеріальної контамінації. Це може свідчити про виражену антибактеріальну дію хітозанових плівок в умовах застосування останніх для лікування при механічних травмах шкіри.

Таблиця 3.2 – Кількісний та якісний склад мікрофлори рани шкіри щурів молодого віку експериментальної серії

Назва мікроорганізму	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
кількість КУО/мл змиву з тампона					
<i>Staphylococcus spp.</i>	≤ 60	≤ 90	≤ 70	≤ 40	≤ 50
<i>Streptococcus spp.</i>	≤ 40	≤ 10 ³	≤ 80	≤ 60	≤ 40
<i>Candida spp.</i>	0	≤ 60	≤ 40	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus spp.</i>	0	0	0	0	0

На 1-шу добу спостереження у зрілих тварин контрольної серії відзначається повна відсутність контамінації рани патогенними бактеріями, при цьому кількість умовно-патогенних *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus salivarius* знаходиться на рівні ≤ 50 та ≤ 70 КУО/мл змиву відповідно.

Проте вже з третьої доби після завдання травми відбувається заселення поверхні дефекту умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами. Золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*), *Streptococcus salivarius*, дріжджоподібні гриби роду *Candida*, *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* – основні представники, що були виділені з поверхні дефекту. Наявність даних мікроорганізмів свідчить про відсутність протимікробного бар'єра при застосуванні стандартного туалету рани. Кількість умовних одиниць (КУО) в 1 мл змиву для *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Candida spp.* на 3-тю добу спостереження становить ≤ 10², а *Bacillus cereus*, *Aspergillus spp.* – ≤ 10³ КУО/мл відповідно.

Через 7 днів після завдання дефекту за умов відсутності антибактеріальної терапії, кількість умовно-патогенних мікроорганізмів збільшується, досягаючи рівня ≤ 10³ КУО/мл для *Staphylococcus spp.*, *Candida*

spp. та *Bacillus cereus*, що достовірно більше порівняно з аналогічними показниками в попередній термін спостереження. Така тенденція збільшення характерна також для *Streptococcus spp.* та *Aspergillus spp.*, кількість яких у тварин контрольної серії становила $\leq 10^4$ КУО/мл відповідно.

На 14-ту добу спостереження у змивах з поверхні дефекту у тварин зрілого віку відзначається незначне зменшення мікробного навантаження, що може бути пов'язане з активністю нейтрофілів та макрофагів ранового ексудату. Так, у цей термін характерна позитивна динаміка для дріжджоподібних грибів роду *Candida spp.* та *Aspergillus spp.*, кількість яких достовірно менша порівняно із сьомою добою після моделювання дефекту та становить $\leq 10^2$ КУО/мл, проте показник вмісту *Bacillus cereus* достовірно збільшився досягнувши рівня $\leq 10^4$ КУО/мл змиву з поверхні рани. Щодо кокових, то потрібно звернути увагу на відсутність динаміки рівня *S. aureus* та зростання кількості *Streptococcus spp.* до 10^3 КУО/мл змиву.

На 21-шу добу спостереження продовжується тенденція щодо зменшення мікробного навантаження на рану. Так, вміст умовно-патогенних мікроорганізмів, таких як стафілококи й стрептококи, достовірно зменшується та становить ≤ 60 та ≤ 80 КУО/мл змиву відповідно. Кількість *Bacillus cereus spp.* порівняно з попереднім терміном спостереження достовірно менша та знаходиться на рівні $\leq 10^2$ КУО/мл. Необхідно відмітити, що для *Aspergillus spp.* на 21-шу добу після травми характерна відсутність динаміки (табл. 3.3).

Застосування інноваційних покриттів на основі хітозану у тварин зрілого віку вже наприкінці першої доби спостереження приводить до відсутності контамінації ранової поверхні патогенними мікроорганізмами. Антибактеріальні властивості плівок приводить до незначного, проте достовірного зменшення вмісту умовно-патогенних мікроорганізмів у рані порівняно з аналогічними показниками контрольної серії. Так, через 1 добу після моделювання механічного дефекту шкіри кількість *Streptococcus spp.* у рані становить ≤ 40 КУО/мл змиву.

Таблиця 3.3 – Кількісний та якісний склад мікрофлори рани шкіри щурів зрілого віку контрольної серії

Назва мікроорганізму	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
кількість КУО/мл змиву з тампона					
<i>Staphylococcus spp.</i>	≤ 50	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	≤ 60
<i>Streptococcus spp.</i>	≤ 70	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^3$	≤ 80
<i>Candida spp.</i>	0	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$	≤ 90
<i>Bacillus cereus</i>	0	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$
<i>Aspergillus spp.</i>	0	$\leq 10^2$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

На третю добу спостереження кількість умовно-патогенних мікроорганізмів у рані продовжує достовірно зменшуватись порівняно з контролем. Кількість *Staphylococcus spp.* становить ≤ 80 , а *Streptococcus spp.* $\leq 10^2$ КУО/мл змиву відповідно. Необхідно зазначити, що патогенні мікроорганізми більш чутливі до антибактеріальної дії хітозанових плівок, оскільки кількість дріжджоподібних грибів роду *Candida* на третю добу становила лише ≤ 90 КУО/мл змиву, а *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* дорівнює нулю.

Через 7 днів після завдання травми відзначається достовірне зменшення кількості *Candida spp.*, щодо показників контрольної серії, так і до попереднього терміну спостереження, становлячи лише ≤ 60 КУО/мл змиву. Починаючи із сьомої доби спостереження такі патогенні мікроорганізми, як *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* повністю відсутні в змивах із поверхні рани.

Під час застосуванні хітозанових плівок на останніх етапах спостереження після моделювання механічної травми шкіри у змивах із поверхні дефекту трапляються лише сапрофітні умовно-патогенні мікроорганізми роду *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, кількість яких

становить ≤ 70 та ≤ 90 на 14 та ≤ 60 та ≤ 50 КУО/мл змиву – на 21-шу добу відповідно (табл. 3.4). Але важливо зауважити, що наявність умовно-патогенних стафілококів та стрептококів у такій кількості є допустимою для неушкодженої шкіри лабораторних тварин.

Отже, можемо зробити висновок: застосування хітозанових плівок дозволило значно зменшити мікробне та грибкове навантаження на рану, що може бути одним із механізмів покращання процесів репарації через зменшення запальної реакції та прискорення переходу репаративних процесів у фази регенерації та епітелізації.

Таблиця 3.4 – Кількісний та якісний склад мікрофлори рани шкіри щурів зрілого віку експериментальної серії

Назва мікроорганізму	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
	кількість КУО/мл змиву з тампона				
<i>Staphylococcus spp.</i>	≤ 60	≤ 80	≤ 90	≤ 70	≤ 60
<i>Streptococcus spp.</i>	≤ 40	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	≤ 90	≤ 50
<i>Candida spp.</i>	0	≤ 90	≤ 60	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus spp.</i>	0	0	0	0	0

Після моделювання механічного дефекту на шкіру у тварин старечого віку на першу добу спостереження відзначається стабільність антибактеріального бар'єра. Адже в змивах з рани шкіри тварин контрольної серії відмічається незначна бактеріальна контамінація, представлена лише сапрофітними умовно-патогенними *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus salivarius* кількістю ≤ 55 та ≤ 75 КУО/мл відповідно.

Проте вже з третьої доби спостереження відзначається розвиток бактеріального запалення в рані, що характеризується значним збільшенням кількості умовно-патогенних *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.* до $\leq 10^3$ та $\leq 10^4$ КУО/мл змиву відповідно та різкою появою патогенних дріжджоподібних грибів роду *Candida spp.*, *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.*, кількісні показники яких на 3-тю добу спостереження у тварин контрольної серії знаходяться на рівнях $\leq 10^4$, $\leq 10^2$ та $\leq 10^3$ КУО/мл змиву відповідно.

Через 7 діб після моделювання механічної травми шкіри у тварин старечого віку, яким застосовували стандартні підходи до лікування, відзначаються різке збільшення кількості мікроорганізмів типу *Bacillus cereus* з $\leq 10^2$ до $\leq 10^4$ КУО/мл змиву та відсутність динаміки у решти раніше ідентифікованих у рані мікроорганізмів. Це є свідченням розвитку бактеріального запалення в рані та низької активності нейтрофілів та макрофагів ранового ексудату у тварин старечого віку контрольної серії.

Через 14 діб після завдання механічної травми на шкірі лабораторним щурам мікробіологічна картина змиву з поверхні дефекту залишається без змін та підтверджує наявність бактеріального запалення. Проте кількість *Streptococcus spp.* та грибів роду *Candida spp.* достовірно зменшується порівняно з аналогічними показниками попереднього терміну спостереження, але залишається на високому рівні, становлячи $\leq 10^3$ до $\leq 10^2$ КУО/мл змиву відповідно. Це може свідчити про зниження реактивності організму лабораторного щура з віком.

На 21-шу добу спостереження мікробіологічна картина змиву з поверхні дефекту у тварин контрольної серії старечого віку характеризується незначною позитивною динамікою. Так, порівняно з даними попереднього терміну кількість сапрофітних умовно-патогенних *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus salivarius* достовірно знижується, проте залишається на високому рівні, що становить $\leq 10^2$ КУО/мл змиву. Щодо патогенних дріжджоподібних грибів роду *Candida*, *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.*, потрібно зазначити достовірне зменшення порівняно з 14-ю добою спостереження. Але паралельно з позитивною динамікою змін (табл. 3.5)

стосовно патогенної мікрофлори відзначаємо велику кількість останніх у бактеріологічних змивах із поверхні дефекту. Адже кількість *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* на 21-шу добу спостереження становить $\leq 10^2$ КУО/мл змиву.

Таблиця 3.5 – Кількісний та якісний склад мікрофлори рани шкіри щурів старечого віку контрольної серії

Назва мікроорганізму	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
	кількість КУО/мл змиву з тампона				
<i>Staphylococcus spp.</i>	≤ 55	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$
<i>Streptococcus spp.</i>	≤ 75	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$
<i>Candida spp.</i>	0	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	≤ 80
<i>Bacillus cereus</i>	0	$\leq 10^2$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$
<i>Aspergillus spp.</i>	0	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$

Застосування хітозанових плівок для лікування механічної рани у тварин старечого віку з першої доби свідчить про створення штучного антибактеріального бар'єра в рані, адже на даному етапі спостереження повністю відсутня контамінація патогенними мікроорганізмами. Кількість умовно-патогенних мікроорганізмів у рані, таких як золотистий стафілокок, *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus salivarius*, становить ≤ 65 та ≤ 45 КУО/мл змиву відповідно.

Через три доби після завдання механічної травми на шкірі тварин експериментальної серії кількість усіх без винятку мікроорганізмів у мікробіологічній картині змиву з поверхні рани порівняно з аналогічними показниками контрольної серії достовірно зменшилися. Відзначається позитивна динаміка в зміні кількості *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* та *Aspergillus spp.* до рівня $\leq 10^2$ КУО/мл змиву. Антибактеріальні властивості

хітозанових плівок, а також активізація нейтрофілів та макрофагів ранового ексудату позитивно впливають на бактеріальну контамінацію рани та приводить до достовірного зниження кількості патогенних дріжджоподібних грибів роду *Candida* та *Bacillus cereus* до $\leq 10^2$ та ≤ 90 КУО/мл змиву відповідно.

На 7-му добу спостереження в змивах з поверхні дефекту тварин експериментальної групи зберігається тенденція до незначного, проте достовірного зменшення бактеріальної контамінації рани. Так, кількість умовно-патогенних коків залишається на тому самому рівні, проте порівняно з аналогічними показниками контролю відбувається достовірне зменшення, кількість останніх становить $\leq 10^2$ КУО/мл змиву. Також необхідно відзначити, що на сьому добу застосування експериментальних хітозанових покриттів у тварин старечого віку в змивах із поверхні рани відсутні патогенні мікроорганізми типу *Aspergillus spp.*

Таблиця 3.6 – Кількісний та якісний склад мікрофлори рани шкіри щурів старечого віку експериментальної серії

Назва мікроорганізму	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
	кількість КУО/мл змиву з тампона				
<i>Staphylococcus spp.</i>	≤ 65	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	≤ 70
<i>Streptococcus spp.</i>	≤ 45	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
<i>Candida spp.</i>	0	$\leq 10^2$	≤ 90	≤ 80	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	≤ 90	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	0
<i>Aspergillus spp.</i>	0	$\leq 10^2$	0	≤ 90	≤ 50

Як бачимо з таблиці 3.6, на 14-ту та 21-шу добу спостереження в експериментальній групі тварин зберігається тенденція не значного, проте

достовірного зменшення бактеріальної контамінації поверхні дефекту. Проте в кокових різна реакція на застосування експериментальних хітозанових покриттів: характерне зменшення кількості *Staphylococcus spp.* до $\leq 10^2$ на 14-ту та до ≤ 70 КУО/мл змиву – на 21-шу добу відповідно та відсутність динаміки для *Streptococcus spp.*, кількість яких залишилася незмінною на рівні $\leq 10^2$ КУО/мл. Необхідно зазначити, що за умов застосування хітозанових плівок кількість патогенних *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.* на поверхні шкіри тварин старечого віку на 14-ту та 21-шу добу значно менше за показники контролю. Це може свідчити про виражені антибактеріальні властивості експериментальних хітозанових покриттів, що застосовувалися для покращання лікування механічної травми шкіри лабораторних тварин.

Матеріали розділу опубліковані в роботах [243, 246, 247, 250-252].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Процес загоєння ран є комплексним біологічним процесом, який залучає відповідь на молекулярному та клітинному рівнях. Кінцевою метою ранового процесу є швидке та функціональне загоєння шарів шкіри та її придатків без формування рубців, а також відновлення фізіологічних функцій зовнішнього покриву. При поверхневому пошкодженні епідермісу, або незначній за глибиною рані, яка не проникає в дерму, відновлення поверхні шкіри відбувається за рахунок реепітелізації, тобто утворення епітелію за рахунок нових кератиноцитів [256]. У той час втрата епідермісу та дерми за умов глибоких механічних пошкоджень приводить до формування глибокої рани, відновлення якої відбувається шляхом утворення сполучної тканини на місці втрачених тканин [257]. Лікування таких пошкоджень потребує використання перев'язувального матеріалу, а в ідеальних умовах залучення імплантатів. На сьогодні існує три категорії матеріалів для пластики дефектів шкіри – біологічні, синтетичні та змішані. [258]. Ало- та ксеношкіра є біологічними матеріалами, які вже біля 100 років використовують для лікування дефектів шкіри. Незважаючи на задовільні клінічні результати, ці матеріали мають ряд недоліків, а саме: високе антигенне навантаження, низьку адгезивність та можливість перехресного інфікування [259]. Зважаючи на відсутність зазначених побічних ефектів, синтетичні полімери в деякий час вважали ідеальним матеріалом для пластики дефектів шкіри. Проте вони не забезпечують стимулювання біологічної відповіді та не впливають на процеси загоювання дефектів [260]. Тому останніми десятиліттями активно розроблюють методики лікування глибоких ран із використанням скафолдів на основі колагену, желатину, хітозану тощо.

Ідеальний матеріал для заміщення дефектів шкіри повинен підтримувати стабільну вологість середовища в рані, забезпечувати газообмін, поглинати надлишковий ексудат та бути активним бар'єром стосовно мікроорганізмів [261]. Крім того, повинен володіти такими властивостями, як кровоспинний

ефект, забезпечувати ріст та проліферацію клітин, можливість блокувати нервові закінчення для зменшення болю та мінімізувати утворення рубцевої тканини [262].

Хітозан є одним з найбільш перспективних матеріалів для використання з метою заміщення дефектів шкіри, кісткової тканини тощо. Хітозан є похідним хітину та був відкритий у 1811 році, але одержав свою назву лише у 1869 році. Хітозан утворюється шляхом деацетилювання хітину за допомогою хітинази. Із 80-х років XIX ст. цей матеріал використовується у медичній практиці. Наразі існують комерційні матеріали на основі хітину та хітозану у вигляді нанофібрил, плівок, губок тощо. Хітозан та його сполуки є не токсичним, що доведено чисельними *iv vivo* та *in vitro* дослідженнями [263]. Проте летальна доза хітозану при пероральному застосуванні залежить як від ступеня деацетилювання, так і від молекулярної маси. Доведено, що високомолекулярний хітозан має більшу токсичність, проте не впливає на ріст та розмноження мікроорганізмів. Установлено, що летальна доза хітозану становить близько 16 г/кг ваги при оральному надходженні, що майже удвічі перевищує таку саму дозу для сахарози. [264] Серед позитивних ефектів хітозану необхідно відзначити протизапальну та імуностимулювальну активність, виражений антимікробний і антиоксидантний ефекти, гемостатичну властивість та здатність стимулювати процеси регенерації.

Найбільш розвинена галузь застосування хітозану – це кровоспинні матеріали та засоби для підсилення регенерації. Незважаючи на широке використання хітозану в практиці, залишається відкритим питання – оптимізації форми випуску, ступеня деацетилювання хітину та молекулярної маси хітозану, який використовується для створення кінцевого продукту. Також відсутні дані щодо впливу хітозану на процеси регенерації різних типів ран та вікової чутливості.

Тому метою нашого дослідження є вивчення особливостей будови шкіри під час використання хітозанових мембран для пластики механічних дефектів зовнішнього покриву у віковому аспекті.

Матеріал для дослідження був розроблений спільно з Інститутом прикладної фізики НАН України (м. Суми) та являє собою прозорі плівки з хітозану різної молекулярної маси – 200, 500 та 700 кДа. Для вибору оптимального матеріалу, який буде використовуватися для лікування механічних дефектів шкіри, були проведені фізико-хімічні дослідження плівок, а саме: растрова електронна мікроскопія – для визначення особливостей рельєфу поверхні; інфрачервона спектроскопія – для визначення хімічного складу, а також визначення швидкості деградації плівок. Зважаючи на дані багатьох авторів щодо різниці токсичності та біосумісності хітозану різної молекулярної маси, було проведене *in vitro* дослідження на культурі фібробластів.

Після фізико-хімічного та токсикологічного оцінювання плівок, ми провели дослідження впливу хітозанових плівок на процеси регенерації механічного дефекту шкіри. Дослідження було проведено на 180 білих лабораторних щурах самцях трьох – вікових груп – молодого (3 місяці), зрілого (9 місяців) та старечого (22 місяці). Усім тваринам в умовах стерильної операційної було завдано стандартного дефекту – механічної травми шкіри з руйнуванням всіх шарів за власною методикою, діаметром 1,5 см.

Контрольній групі тварин після нанесення дефекту проводився стандартний туалет рани з використанням стерильних марлевих пов'язок, заміну яких здійснювали щоденно.

Експериментальній серії тварин для місцевого лікування рани з першої доби після травми використовували експериментальні хітозанові покриття, заміну яких проводили щоденно.

Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після завдання травми, що відповідає термінам, які характеризують основні етапи регенераційних процесів шкіри. Упродовж усього терміну проведення експерименту тварин щодня оглядали, відзначали їх загальний стан, активність, характер шерстяного покриву, стан рани та прилеглих тканин.

Для визначення особливостей загоєння дефектів шкіри використовували планіметричні та цитологічні методи дослідження, а також гістоморфометрію гістологічних препаратів рани шкіри. З метою визначення впливу продуктів деградації хітозану на мікробне оточення рани проводили виділення та ідентифікацію мікроорганізмів із поверхні рани.

Порівняння середніх величин, одержаних за результатами експериментів, здійснювали за допомогою Т-критерію для незалежних вибірок. Достовірною вважали різницю при Т менше ніж 0,05.

Інфрачервона спектроскопія довела, що плівки, утворені з хітозану різної молекулярної маси, мають подібні спектри. Дослідження мембран методом растрової електронної мікроскопії довело відмінність у будові одержаних матеріалів. Збільшення молекулярної маси приводить до утворення більш рівної поверхні матеріалів. Проте відомо, що наявність розвиненого рельєфу (особливо в мікро- та нанодіапазах) є сприятливим чинником для адсорбції протеїнів плазми крові та адгезії клітин. Таким чином, матеріали з низькомолекулярного хітозану, які мають найбільш розвинений рельєф поверхні, є найбільш перспективними для застосування як скафолдів для пластики дефектів шкіри. Також матеріали з хітозану 200 та 500 кДа мають більшу пористість порівняно з високомолекулярним хітозаном. Наявність пор необхідна для забезпечення міграції клітин у середину скафолдів, а також наявності таких властивостей, як сорбційна здатність та паропровідність. Таким чином, за даними фізико-хімічних досліджень, плівки з молекулярною масою 200 та 500 кДа є найоптимальнішими для клінічного застосування.

Використання будь-яких біоматеріалів неможливе без визначення їх цитотоксичності та біосумісності. Найбільш простий та об'єктивний метод дослідження цих параметрів є культивування специфічних клітин на поверхні матеріалів. У нашому експерименті використовувалася культура фібробластів людини, ріст яких на поверхні матеріалів простежувався з 3-ї по 14-ту добу. Результати експерименту показали, що формування моношару клітин до 14-ї доби відбувається лише на поверхні плівок із молекулярною масою 500 та 700 кДа. На поверхні плівки з молекулярною масою 200 кДа відсутнє формування

суцільного шару. При цьому клітини втрачають типовий фенотип. Реакція редукції резазурину показала, що активність клітин на поверхні низькомолекулярного хітозану менша за показники фібробластів, ріст яких відбувався на поверхні культурального пластику (контроль). При цьому флюоресценція резазурину на 14-ту добу в культурі клітин на поверхні зразків з молекулярною масою 500 та 700 кДа у півтора – два рази вища. Ці дані свідчать, що високомолекулярний хітозан є нетоксичним та має стимулювальний вплив на ріст фібробластів у культурі клітин.

Таким чином, за результатом вивчення фізико-хімічних параметрів та цитотоксичності плівок із хітозану різної молекулярної маси, для проведення досліджень на тваринах, ми відібрали матеріал, синтезований із хітозану молекулярною масою 500 кДа. Ці плівки мають розвинений рельєф поверхні, наявність мікропор у середині та показали стимулювальний вплив на проліферацію фібробластів.

У процесі загоєння рани виділяють три фази – запалення, проліферацію та загоєння. У першій фазі ранового процесу, що триває в середньому до 4-ї доби, відбувається заповнення дефекту згустком крові та тканинним ексудатом. Відбувається спазм судин та утворення тромбів. Проте за 10 – 15 хвилин відзначається дилатація судинного русла, порушення проникності стінки судин, ексудація та розвиток набряку. У цій фазі відбувається нейтрофільна грануляція, переміщення лімфоцитів та макрофагів у зону ушкодження. Утворений лейкоцитарний вал забезпечує фагоцитоз та очищення рани від некротичних тканин [265]. В очищенні рани важливу роль відіграють макрофаги, які містять лізосомальні ферменти, зокрема рибонуклеази, кислі фосфатази, протеази тощо [266]. Відомо, що продукти деградації хітозану здатні впливати на процеси міграції лейкоцитів та макрофагів, а також збільшувати активність клітин [267]. У нашому експерименті вже з першої доби застосування хітозанових мембран відзначається зменшення кількості лейкоцитів на поверхні дефекту у тварин зрілого та старечого віку, а також нейтрофілів у щурів молодого віку. Проте

кількісний склад клітин рани істотно змінюється вже з 3-ї доби, достовірно зростає кількість макрофагів у щурів усіх вікових груп (рис. 4.1)

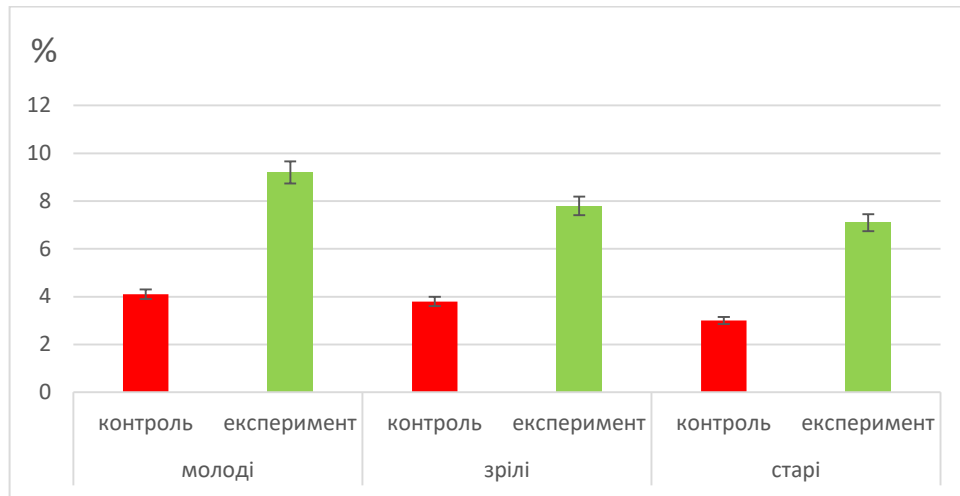


Рисунок 4.1 – Відсоток макрофагів у цитологічних препаратах із поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Також майже вдвічі зростає кількість моноцитів у тварин зрілого та старечого віку (рис. 4.2)

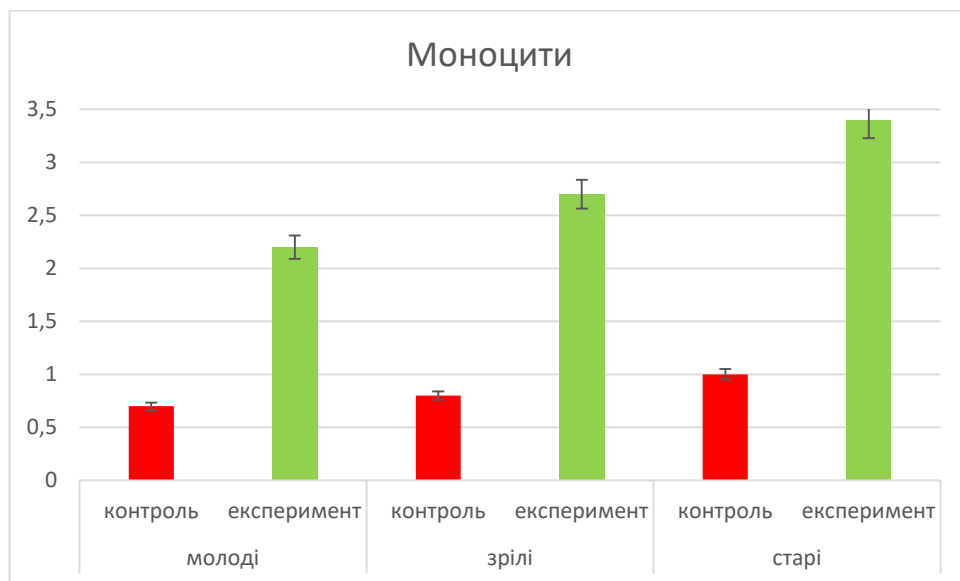


Рисунок 4.2 – Відсоток моноцитів у цитологічних препаратах з поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Збільшення кількості фагоцитів на поверхні рани приводить до прискорення очищення ділянки ушкодження від некротичних мас та повинне сприяти більш ранньому початку утворення сполучної тканини. Крім того, активація макрофагальної ланки імунітету здатна запобігти бактеріальній контамінації поверхні рани [258] (рис.4.3)

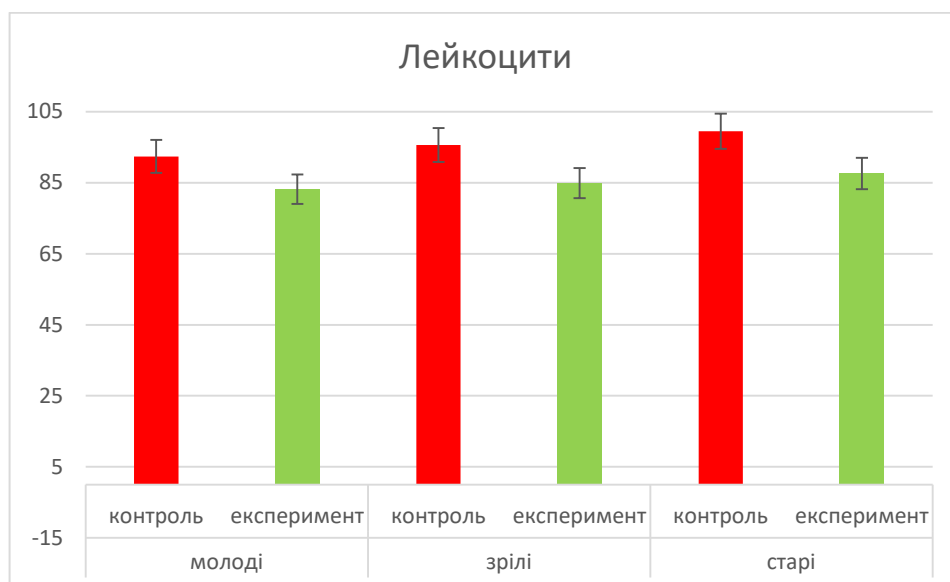


Рисунок 4.3 – Кількість лейкоцитів у цитологічних препаратах з поверхні рани шкіри тварин різних вікових груп контрольної та експериментальної серій на 3-тю добу після травми

Фаза проліферації без чіткої межі з попередньою починається з 3-ї, 4-ї діб після ушкодження. У цій фазі продовжується некроліз, очищення рани від некротичних тканин та починається розвиток грануляцій. Залежно від глибини рани та її типу дана фаза закінчується через 15 – 30 діб [265]. Основною метою керування процесами регенерації в цій фазі є прискорення очищення рани та стимуляція проліферативних процесів.

На 7-му добу спостереження у нашому експерименті при застосуванні хітозанових мембран, за результатами планіметричного дослідження, не відбувається загоювання площі дефекту у тварин усіх вікових груп, проте відносна площа некрозу достовірно зменшується у тварин усіх вікових періодів. Зростає кількість та функціональна активність макрофагів, що в

попередній термін спостереження імовірно сприяла цим процесам. Утворення грануляцій починається з дна рани. Важливе значення на цьому етапі відіграє ендотелій капілярів, який бере участь в утворенні нових судин і фіброblastів, що синтезують позаклітинний матрикс [265]. Площа грануляцій за результатами планіметричних досліджень достовірно перевищує контроль у тварин молодого та зрілого віку. Використання хітозанових плівок приводить до зменшення набряку шкіри у тварин усіх вікових груп, а також до зниження відносної площі судин дерми у молодих тварин, що свідчить про нормалізацію судинної реакції. Основну роль у процесах утворення грануляцій відіграють судини. Їх відносна площа у тварин усіх вікових груп значно перевищує контроль. Деякі дослідники довели, що за умов впливу хітозану відбувається секреція судинного ендотеліального фактора росту, що приводить до підвищення проліферації ендотеліоцитів та утворення судин. Навіть за умов моделювання діабету у мишей спостерігалась активація ангиогенезу в рані при використанні хітозанових нановолокон [268].

До 14-ї доби спостереження відбувається загоєння площі дефекту у тварин як контрольної, так і експериментальної серії. При цьому різниця з контролем відзначається лише у тварин молодого віку. В даний термін спостереження відбувається дозрівання грануляційної тканини, заміщення її тканиноспецифічними структурами та початок активації епітелізації поверхні. Планіметричні показники показали зменшення площі грануляцій на поверхні дефекту у тварин усіх вікових груп за рахунок достовірного зростання площі епітелізованих ділянок (рис 4.4). Гістоморфометрія показала майже повну відсутність набряку у тварин молодого та зрілого, а також його достовірне зменшення – у щурів старечого віку. Основними механізмами зменшення набряку за умов застосування хітозану є сорбція надлишкового ексудату з перших днів лікування та вплив на судинне русло [269]. На відміну від попереднього терміну спостереження відносна площа та середній діаметр судин грануляційної тканини достовірно відрізняється від контролю лише у тварин старечого віку та становить 6,37 % та 22,39 мкм відповідно.

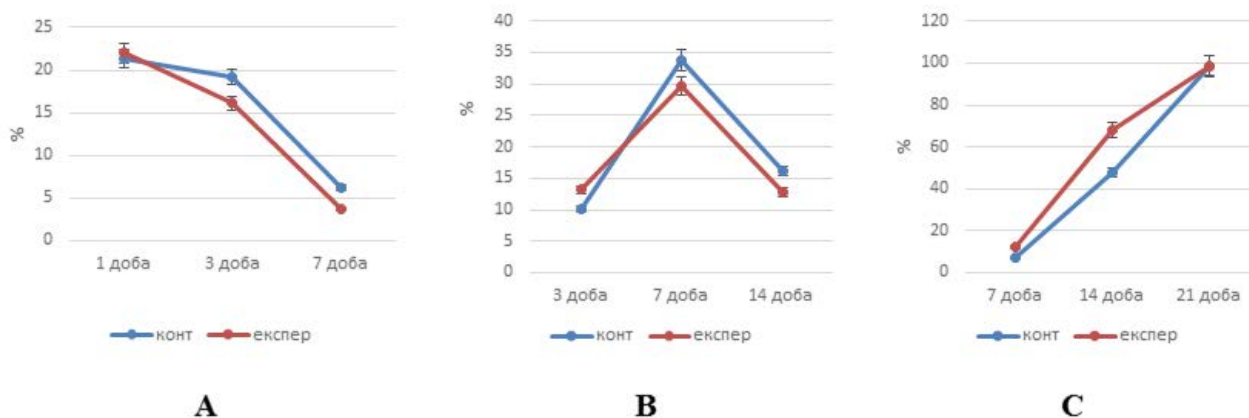


Рисунок 4.4 – Динаміка зміни відносної площі некрозу (А), грануляційної тканини (В) та епітелізованих ділянок (С) поверхні дефекту шкіри у молодих тварин контрольної та експериментальної серій

Формування тканинспецифічних структур шкіри відбувається за рахунок синтезу міжклітинного матриксу фібробластами. Дослідження впливу хітозану на культуру фібробластів показало його здатність до стимуляції адгезії та проліферації клітин [270]. Позитивно заряджені аміногрупи хітозану вступають в електростатичну взаємодію з глікозаміногліканами, які є ростовим фактором, що здатний впливати на ріст фібробластів та їх проліферацію. Крім того, доведено, що за наявності хітозану відбувається паралельне укладання молекул колагену, що зменшує ризик розвитку рубців [271].

Початок епітелізації поверхні дефекту, за даними планіметрії, відбувається з 7-ї доби спостереження. При чому площа епітелізації зменшується з віком майже удвічі. Використання хітозанових мембран приводить до збільшення площі краю епітелізації у тварин усіх вікових груп на 7-му та 14-ту доби спостереження. При цьому відносна площа епітелізації тканин становить $(12,21 \pm 0,17) \%$ та $68,11 \%$ у щурів молодого віку, $(6,48$

$\pm 0,11) \%$ та $56,10 \%$ – зрілого, $(3,95 \pm 0,19)$ та $(45,91 \pm 1,93) \%$ – старечого відповідно. На сьогодні відсутні дані щодо прямого впливу хітозану на процеси епітелізації, тому ми можемо зробити припущення, що використання

хітозану має опосередкований вплив на епітелізацію через нормалізацію кровопостачання ділянки дефекту, зменшення запалення та прискорення утворення тканинспецифічних структур дерми [272]. Таким чином, вплив хітозану на процеси регенерації у фазу проліферації полягає у зменшенні набряку, стимуляції росту судин грануляційної тканини та прискоренні епітелізації поверхні дефекту.

Третя фаза ранового процесу – фаза загоювання. Вона характеризується утворенням рубцевої тканини та епітелізацією поверхні дефекту. Кінцеве формування рубцевої тканини та епітелізація відбуваються через 1 тиждень від початку даної фази. Проте залежить від розмірів рани, ступеня пошкодження тканин, кількості та вірулентності мікроорганізмів, які попали в рану, загального стану організму, віку та методів лікування [265]. У цій фазі відбувається дозрівання грануляційної тканини, що супроводжується запуском судин, зменшенням кількості клітинних елементів, зокрема макрофагів, лейкоцитів та фібробластів. У даний період відбувається активація процесів розвитку колагенових та еластичних волок, а також епітелізація поверхні дефекту, що відбувається за рахунок міграції епітеліальних клітин від країв до середини рани [265]. У молодих тварин контрольної серії на 21-шу добу спостереження відбувається повна епітелізація дефекту, а у щурів інших вікових груп незначні за площею дефекти – $(0,16 \pm 0,04)$ та $(0,23 \pm 0,06)$ см² відповідно. Відносна площа епітелізації становить від $(76,34 \pm 2,14)$ % у щурів старечого віку до $(98,71 \pm 1,12)$ % - у молодого. Неепітелізовані ділянки представлені рубцевою тканиною. За умов використання хітозанових мембран на 21-шу добу спостереження відбувається повне закриття дефекту у твар усіх вікових груп. Відносна площа епітелізації поверхні значно зростає, особливо у щурів старечого віку та становить $(88,62 \pm 1,71)$ %. У тварин інших вікових груп поверхня рани майже на 100 % вкрита епітелієм. Таким чином, застосування хітозану приводить до зменшення утворення рубцевої тканини, що особливо помітно у тварин старечого віку. Цитологічні дослідження зіскобів дефекту на 21-шу добу у тварин контрольної серії показало наявність незначної кількості

лейкоцитів, серед яких домінували нейтрофіли та лейкоцити. У мазках відзначається значна кількість фібробластів та ендотеліоцитів. У тварин експериментальної серії відзначається достовірне зменшення як загальної кількості лейкоцитів, так і відсотка нейтрофілів. Кількість лімфоцитів, макрофагів та ендотеліоцитів достовірно не змінюється.

Дослідження гістологічних препаратів у тварин контрольної серії на 21-шу добу спостереження свідчить про відсутність стромального набряку у тварин молодого та зрілого віку, а також незначний за площею набряк у щурів старечого – $(4,39 \pm 0,81) \%$. Відносна площа судин дерми та грануляційної тканини, а також середній діаметр судин на 21-шу добу у тварин контрольної серії свідчить про відсутність судинної реакції. Застосування хітозану достовірно не впливає на зазначені показники. При цьому спостерігається значне та достовірне зменшення відносної площі стромального набряку у тварин старечого віку до $(3,53 \pm 0,36) \%$.

Гістологічні дослідження препаратів шкіри тварин експериментальної серії показало формування сполучної тканини з будовою, типовою для дерми. Відмінністю від контрольної серії є упорядкованість пучків колагенових та еластичних волокон. За даними деяких дослідників, олігомери хітозану здатні упорядковувати розміщення колагенових фібрил через безпосередній вплив на секретуючі клітини – фібробласти [271]. Ця властивість хітозану дозволила попередити утворення рубцевої тканини у тварин молодого та зрілого і зменшити її формування – у щурів старечого віку.

Бактеріальна контамінація є одним з основних факторів, що здатний негативно впливати на процеси регенерації дефектів шкіри. Хронізація запалення може призвести навіть до утворення трофічних виразок та розвитку дизрегенерації. Основними мікроорганізмами, що спричинюють ускладнення, є умовнопатогенні бактерії. У нашому експерименті у тварин контрольної серії відзначається активна колонізація поверхні рани з 3-ї доби після травми та збільшення їх загальної кількості до 7-ї доби. Основними виявленими мікроорганізмами були *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Candida spp.*, *Bacillus cereus* та *Aspergillus spp.*. З 14-ї до 21-ї доби спостереження

відбувається зменшення кількості мікроорганізмів на поверхні рани у тварин молодого та зрілого віку, проте у щурів старечого віку їх кількість залишається клінічно значущою.

Застосування хітозану приводить до зменшення колонізації поверхні рани мікроорганізмами, особливо у тварин молодого та зрілого віку. У тварин старечого віку у змивах із поверхні рани на 3-ю добу представлений весь спектр мікроорганізмів, характерний для щурів контрольної серії, проте їх кількість є значно меншою. До 21-шу доби спостереження з поверхні рани виділяються лише стрептококи та стафілококи у кількості, характерній для тварин контрольної серії.

Механізм антибактеріальної дії хітозану полягає як у прямому впливі на мікроорганізми, так і має опосередкований характер (рис. 4.5). Відомо, що позитивно заряджені олігомери хітозану здатні зв'язуватися з негативно зарядженою стінкою мікроорганізмів, що блокує розмноження та міграцію клітин [273]. Крім того, олігомери низькомолекулярного хітозану здатні проникати в середину бактеріальних клітин та зв'язуватися з мРНК, тим самим блокуючи синтез білків та призводячи до загибелі клітин [274]. Більшість дослідників вказують на бактеріостатичну дію хітозану, проте є докази і бактерицидного ефекту [275]. Опосередкована дія хітозану полягає у стимуляції міграції лімфоцитів та макрофагів у рановий дефект та активації процесів фагоцитозу [276]. Цей механізм може пояснити меншу антибактеріальну дію хітозанових плівок у тварин старечого віку експериментальної серії. Адже відомо, що кількість макрофагів та їх чутливість до зовнішніх впливів значно зменшується з віком [277].

Таким чином, аналізуючи одержані результати та спираючись на дані літератури, ми можемо запропонувати таку схему змін процесів регенерації шкіри за умов застосування хітозанових мембран.

У фазу запалення хітозанова мембрана служить бар'єром між зовнішнім середовищем та поверхнею дефекту. Сорбційні властивості мембрани забезпечують відведення надлишку ексудату, а паропровідність забезпечує газообмін та створення оптимального мікросередовища для початку процесів

регенерації. Крім того, мембрана є механічним бар'єром для мікроорганізмів, а продукти її деградації мають пряму антибактеріальну дію. Олігомери хітозану, які виділились у процесі біодеградації стимулюють міграцію лейкоцитів та макрофагів, регулюють активність імунокомпетентних клітин та активують фагоцитоз. Усе це приводить до прискорення очищення ранового ложа від некротизованих мас та сприяє більш ранньому початку розвитку сполучної тканини.

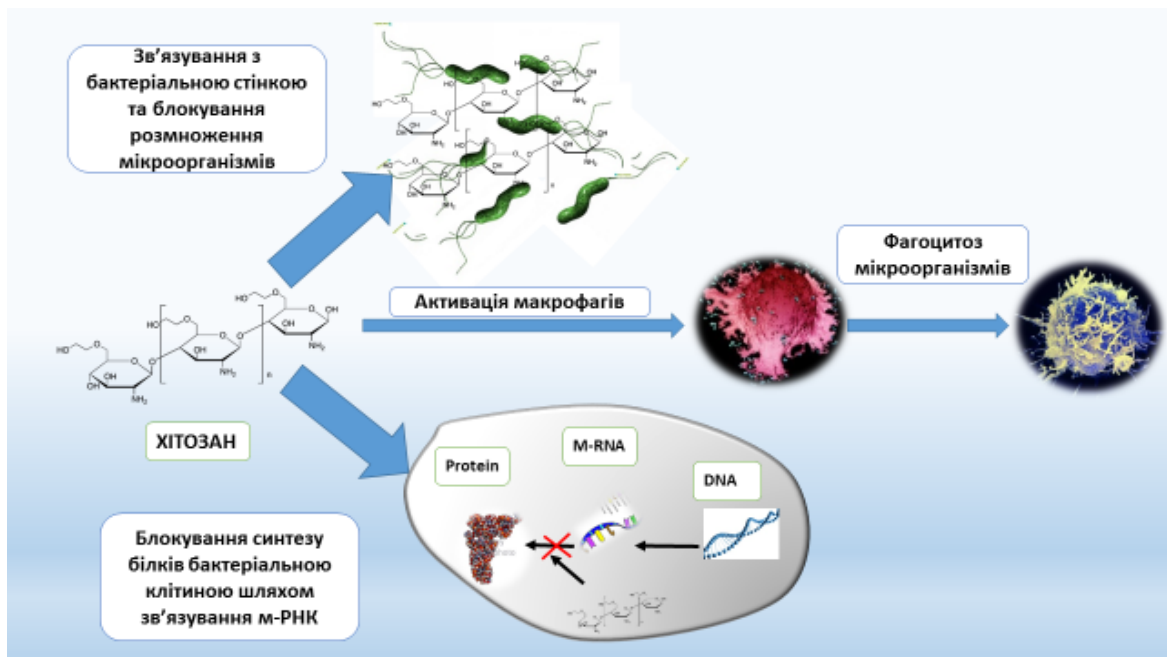


Рисунок 4.5 – Механізм антибактеріальної дії хітозану

У фазі проліферації хітозанова мембрана все ще забезпечує оптимальне мікросередовище та слугує бар'єром для мікроорганізмів. Вплив олігомерів хітозану на міграцію фібробластів та регуляцію синтезу колагену приводить до більш раннього утворення грануляційної тканини. Хітозан стимулює ангіогенез грануляційної тканини шляхом впливу на ендотеліоцити, що приводить до прискорення вивільнення факторів росту. Очищення поверхні рани в першій фазі регенерації та раннє формування грануляційної тканини і відсутність бактеріального запалення призводять до початку краєвої епітелізації, що відбувається за рахунок міграції епітеліоцитів із країв рани.

У фазі регенерації відбувається формування усіх шарів дерми та епідермісу за рахунок регуляції синтезу колагену та оптимізації просторової орієнтації колагенових фібрил. Ці ефекти олігомерів хітозану реалізуються за рахунок безпосереднього впливу на фіброblastи (рис. 4.6).

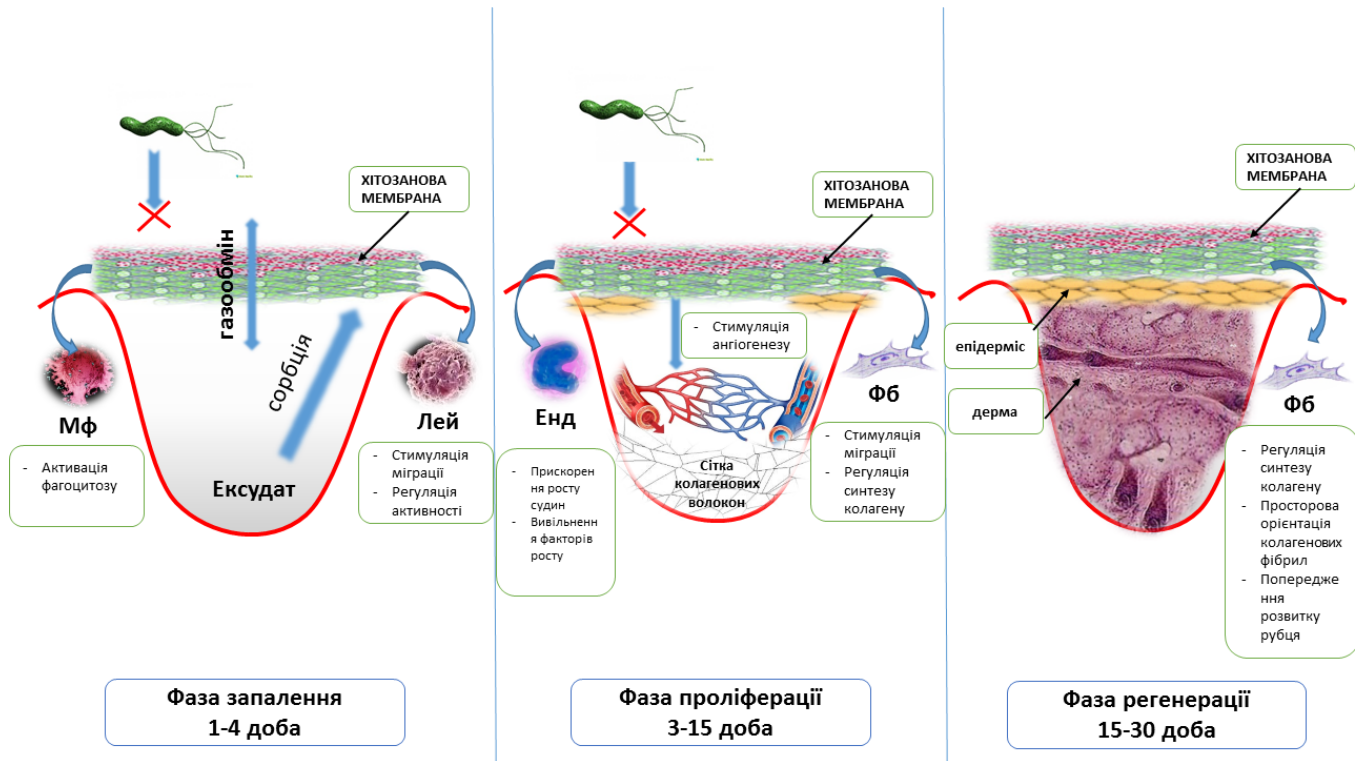


Рисунок 4.6 – Механізми впливу хітозанової мембрани на регенерацію механічного дефекту шкіри в різні фази репаративного процесу:

Мф – макрофаг; Лей – лейкоцит; Енд – ендотеліоцит; Фб – фіброblast

Таким чином, мембрани хітозану з молекулярною масою 500 кДа можуть бути ефективним засобом медичного призначення та призводити до оптимізації процесів регенерації глибоких механічних дефектів шкіри.

Матеріали розділу опубліковані в роботах [244, 245, 248, 249, 254]

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подане теоретичне обґрунтування та вирішене практично-наукове завдання, а саме визначення особливостей морфо-функціонального стану шкіри тварин різного віку за умов застосування хітозанових плівок після механічної травми.

1. Дослідження фізико-хімічних властивостей мембран, одержаних із хітозану різної молекулярної маси (200, 500 та 700 кДа), показало їх однорідний хімічний склад та наявність структурних відмінностей, які полягають у зменшенні пористості зі збільшенням молекулярної маси та зростанням нерівності поверхні мембран за умов зниження молекулярної маси хітозану від 700 до 200 кДа. Культивування фібробластів на поверхні мембран довело відсутність клітинної токсичності мембран, при цьому матеріали з хітозану молекулярними масами 500 та 700 кДа мають стимулювальний вплив на проліферацію клітин у культурі. Таким чином, плівки з хітозану молекулярною масою 500 кДа мають оптимальні характеристики для застосування з метою пластики дефектів шкіри.

2. Ушкодження шкіри у контрольних тварин усіх вікових груп супроводжується утворенням ділянки некрозу, зростанням кількості нейтрофілів на поверхні рани, розвитком стромального набряку та судинної реакції у вигляді повнокров'я судин та стазу еритроцитів. Третя та сьома доби після травми характеризуються міграцією макрофагів та полібластів у ділянку дефекту, які беруть участь в очищенні рани та формуванні грануляційної тканини, відсоток якої максимально зростає з $(10,12 \pm 0,61)$ на 3-тю добу до $(33,72 \pm 1,04)$ % на 7-му добу у щурів молодого віку. На 21-шу добу спостереження відзначається епітелізація ділянки дефекту та формування рубцевої тканини, кількість якої більша у тварин старечого віку.

3. Застосування хітозанових мембран приводить до достовірного зростання площі грануляційної тканини на 3-тю добу спостереження у тварин усіх вікових груп (максимальний показник у тварин молодого віку до $(13,21 \pm 0,46)$ % ($p = 0,0023$)). Із 7-ї доби кількість грануляційної тканини зменшується, що свідчить про формування сполучнотканинного регенерату. Загальна площа

дефекту при цьому достовірно менша порівняно з контрольними показниками лише у тварин молодого віку ($0,35 \pm 0,05$) см² ($p = 0,0183$). Клітинний склад рани характеризується зменшенням кількості нейтрофілів та лімфоцитів в усі терміни спостереження та зростанням відсотка макрофагів та фібробластів із 3-ї та 7-ї діб відповідно. Кількість ендотеліоцитів максимально зростає з 7-ї доби та становить залежно від віку від ($3,1 \pm 0,16$) % ($p = 0,1075$) (старечого віку) до ($7,2 \pm 0,44$) % ($p = 0,0246$) (тварин молодого віку). Оптимізація клітинного складу рани за умов застосування хітозану є підґрунтям прискорення процесів регенерації.

4. При дослідженні морфометричних показників за умов застосування хітозаної мембрани відбувається нормалізація судинної реакції, що супроводжується зменшенням відносної площі набряку стріми у тварин молодого та зрілого віку з 3-ї доби, а у щурів старечого віку – 7-ї доби спостереження. Відносна площа судин дерми та їх діаметр зменшується лише у тварин молодого віку до ($6,90 \pm 0,47$) % ($p = 0,5481$) та ($17,77 \pm 1,25$) мкм ($p = 0,2051$) відповідно. Дані гістологічного дослідження свідчать про більш ранній початок утворення грануляційної тканини, особливо у тварин молодого віку (з 3-ї доби спостереження) та оптимізацію формування сполучної тканини, а також епітелізації поверхні рани до 21-ї доби. У щурів молодого та зрілого віку відсутні рубцеві зміни, в той час як у тварин старечого віку їх кількість значно менша, ніж у контролі.

5. Використання хітозанових мембран приводить до зменшення колонізації поверхні рани умовно-патогенними мікроорганізмами на ранніх етапах репаративного процесу у тварин молодого та зрілого віку. До 21-ї доби спостереження на поверхні рани спостерігається наявність лише стафілококів та стрептококів у кількості від ≤ 40 до ≤ 102 КУО/мл. Лише у тварин старечого віку спостерігається наявність *Aspergillus spp.* у кількості ≤ 50 КУО/мл, що свідчить про вікову залежність ефективності хітозанових мембран.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Changes in cellular motility and cytoskeletal actin in fibroblasts from patients with chronic venous insufficiency and in neonatal fibroblasts in the presence of chronic wound fluid / J. D. Raffetto, M. V. Mendez, B. J. Marien [et al.] // *J. Vasc Surg.* – 2001. – Vol. 33. – P. 1233–1241.
2. Motta G. The Kestrel wound product sourcebook / G. Motta // Bristol, Vermont7 Kestrel Health Information Inc. - 2005.
3. Доклад о состоянии безопасности дорожного движения в мире [Электронный ресурс]. World Health Organization – Офіц. Веб-сайт. Режим доступу до документа:
http://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/report/summary/gsrss_summary_ru.pdf
4. Wound healing - A literature review / A. C. Gonzalez, T. F. Costa, Z. A. Andrade [et al.] // *An Bras Dermatol.* – 2016. – 91(5). – P. 614-620.
5. Internal dressings for healing perianal abscess cavities / S. R. Smith, K. Newton, J. A. Smith [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2016. – doi: 10.1002.
6. Skin appendage-derived stem cells: cell biology and potential for wound repair / J. Xie, B. Yao, Y. Han [et al.] // *Burns & Trauma.* – 2016.–doi: 10.1186.
7. Adam J. S. Current Management of Acute Cutaneous Wounds / J. S. Adam, A. B. Dagum // *N. Engl . J. Med.* – 2008. – Vol. 359. – P. 1037–1046.
8. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration / P. S. Korrapati, K. Karthikeyan, A. Satish [et al.] // *Materials Science and Engineering* – 2016 – Vol. 67. – P. 747–765.
9. Sood A. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data / A. Sood, M. S. Granick, N. L. Tomaselli // *Advances in Wound Care (New Rochelle)* – 2014. – Vol. 3 (8). – P. 511–529.

10. In vitro characterization of a chitosan skin regenerating template as a scaffold for cells cultivation / A. B. Hilmi, A. S. Halim, A. Hassan [et. al.] // Springerplus. – 2013. – Vol. 2 (1):79. – doi: 10.1186.
11. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends / W. Yu-Bey, Y. Shu-Huei, M. Fwu-Long [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2004. – Vol. 57 (7). – P. 435–440.
12. Willoughby D.A. Inducible enzymes in the inflammatory response / D. A. Willoughby, A. Tomlinson // Basel, CH: Birkhauser Verlag. – 1999. – ID. 14079887.
13. Fabrication, structure, and properties of chitin whisker-reinforced alginate nanocomposite fibers / A. Watthanaphanit, P. Supaphol, H. Tamura [et al.] // J. Appl. Polym. Sci. – 2008. – Vol. 110. – P. 890.
14. Preparation and characterization of novel α -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications / K. Madhumathi, N. S. Binulal, H. Nagahama [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2009. – Vol. 44. – P. 1–5.
15. Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications / K. T. Shalumon, N. S. N. Binulal, Selvamurugan [et al.] // Carbohydr Polym. – 2009. – Vol. 77. – P. 863–869.
16. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture / K. T. Shalumon, K .H. Anulekha, C. M. Girish [et al.] // Carbohydr polym. – 2010. – Vol. 80. – P. 413–419.
17. Prabaharan M. Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery / M. Prabaharan // Biomater Appl. – 2008. – Vol. 23. – P. 5-36.
18. Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications / A. Anitha, N. Deepa, K. P. Chennazhi [et al.] // Carbohydr Polym. – 2011. – Vol. 83. – Is. 1. – P. 66–73.
19. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin / A. Portero, D. Teijeiro-Osorio, M. J. Alonso [et al.] // Carbohydr Polym. – 2007. – Vol. 68. – P. 617–625.

20. Functional characterization of chitosan / I. Aranaz, M. Mengíbar, R. Harris [et.al.] // *Curr Chem.* – 2009. – Vol. 3. – P. 203–230.
21. Chitosan a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications / M. Dasha, F. Chiellinia, R. M. Ottenbrite [et.al.] // *Progress in Polymer Science.* – 2011. – Vol. 36. – Is 8. – P. 981–1014
22. Khora E. Implantable applications of chitin and chitosan / E. Khora, L. Y. Limb // *Biomaterials.* – 2003. – Vol. 24. – Is 13. – P 2339–2349.
23. Vacanti C. A. The history of tissue engineering. / C. A. Vacanti // *J Cell Mol Med.* – 2006. – Vol. 10. – P. 569–576.
24. Venkatesan J. Chitosan composites for bone tissue engineering – an overview / J. Venkatesan, S. K. Kim // *Mar Drugs.* – 2010. – Vol. 8. – P.2252–2266.
25. Cartilage tissue engineering on fibrous chitosan scaffolds produced by a replica molding technique / G. R. Ragetly, G. J. Slavik, B. T. Cunningham [et. al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2010. – Vol. 93. – P. 46–55.
26. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cells chondrogenesis / G. R. Ragetly, D. J. Griffon, H. B. Lee [et.al.] // *Acta Biomater.* – 2010. – Vol. 6. – P. 1430–1436.
27. Muzzarelli R. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone / R. A. Muzzarelli // *Carbohydr Polym.* – 2009. – Vol. 76. –P. 167–182.
28. Chitosan–alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat / M. Dai, X. Zheng, X. Xu [et. al.] // *J Biomed Biotechnol.* – 2009. – doi: 10.1155.
29. Preparation, characterization and evaluation of biocomposite films containing chitosan and sago starch impregnated with silver nanoparticles / P. Marie Arockianathana, S. Sekara, , B. Kumaranb [et. al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2012. – Vol. 50. Is. 4. – P.939–946.
30. Chitosan coated poly(vinyl alcohol) nanofibers for wound dressings / Y. O. Kang, I. S. Yoon, S. Y. Lee [et. al.] // *J Biomed Mater Res B.* – 2010. – Vol. 92. – P. 568–576.

31. Radhakumary C. Drug loaded thermoresponsive and cytocompatible chitosan based hydrogel as a potential wound dressing / C. Radhakumary C., M. Antony, K. Sreenivasan // *Carbohydr Polym.* – 2011. – Vol. 83. – P. 705–713.
32. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications / Ashish Deva, N. S. Binulala, A. Anithaa [et. al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – Vol. 80. – P. 833–838.
33. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications / Ashish Deva, Jithin C. Mohana, V. Sreejaa [et. al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – Vol. 79. – P. 1073–1079.
34. Biofabrication with chitosan / H. Yi, L. Q. Wu, W. E. Bentley // *Biomacromolecules.* – 2005. – Vol. 6. – P. 2881–2894.
35. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation/ P. Roughley, C. Hoemann, E. Desrosiers // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27 (3). – P. 388–396. – Epub 2005.
36. Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system / H. Ehrlich, B. Krajewski, T. Hanke // *J Membr Sci.* – 2006. – Vol. 273. – P. 124–128.
37. Bioactive and osteoblast cell attachment studies of novel α - and β - chitin membranes for tissue-engineering applications / R. Jayakumar, R. V. V. Divya, K. T. Shalumon [et al.] // *J Biol Macromol.* – 2009. – Vol. 45. – P. 260–264.
38. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications / R. Jayakumar, M. Prabaharan, S. V. Nair [et. al.] // *Biotechnol Adv.* – 2010. – Vol. 28. – P. 142–150.
39. Morganti P. Chitin nanofibrils for advanced cosmeceuticals / P. Morganti / G. Morganti // *Clin Dermatol.* – 2008. – Vol 26. – P. 334–340.
40. Jayakumar R Synthesis and characterization of pH-sensitive thiol-containing chitosan beads for controlled drug delivery applications / R. Jayakumar, / RL Reis, J. F. / Mano // *Drug Deliv.* – 2007. – Vol. 14. – P.9–17.
41. Prabaharan M. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems / M. Prabaharan / Mano JF.// *Drug Deliv.* – 2005. – Vol. 12. – P. 41–57.

42. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate-chitosan nanoparticles / A. Anitha, V. G. Deepagan, R. V. V. Divya // *Carbohydr Polym.* – 2011. – Vol. 84. – P.1158–1164.
43. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications / R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar // *Biotechnol Adv.* – 2011. – Vol. 29. – P. 322–337.
44. Prabakaran M. Electrospun nanofibrous scaffolds – current status and prospects in drug delivery / M. Prabakaran, R. Jayakumar, S. V. Nair // *Adv Polym Sci.* – 2012. – Vol. 246. – P. 241–262.
45. In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation / K. Muramatsu, S. Masuda, S. Yoshihara [et. al.] // *Polym Degrad Stabil.* – 2003. – Vol. 81. – P. 327–332.
46. Khor E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise / E. Khor // *Biomaterials.* – 2001. – Vol. 23. P. 3913–3925.
47. Rinaudo M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials / M. Rinaudo // *Polym Int.* – 2008. – Vol. 57. – P. 397–430.
48. Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications / K. Madhumathi, K. T. Shalumon, R. V. V. Divya, [et al.] // *Int J Biol Macromol.* 2009 – Vol.45. – P. 12–5.
49. Chitin scaffolds in tissue engineering / R. Jayakumar, K. P. Chennazhi, S. Sowmya [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2011. – Vol. 12. – P. 1876–1887.
50. Fabrication of chitin–chitosan/nano ZrO₂ composite scaffolds for tissue engineering applications / R. Jayakumar, R. Ramachandran, P. T. Sudheesh Kumar [et al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2011. –Vol. 49. – P. 274–280.
51. Thermogravimetric analysis of chitins of different origin / D. Stawski, S. Rabiej, L. Herczynska [et al.] // *J Therm Anal Calorim.* – 2008. –Vol. 93. – P. 489–494.

52. Zhou Y. Targeted synthesis and environmental applications of oxide nanomaterials / Y. Zhou, G. R. Patzke [et al.] // *Chimia (Aarau)*. – 2010. –Vol. 64 (4). – P. 252-258.
53. Integrated sponge culture in the MPA “Capo Cassia–Isola Piana”: the case of *Aplysina aerophoba* (Aplysinidae, Verongidae) / R. Manconi, F. D. Ledda, M. F. Ortu [et al.] // *Biol Mar Mediterr*. – 2005. – Vol. 12. – P. 191–194.
54. Wan A. C. Hydroxyapatite modified chitin as potential hard tissue substitute material / A. C. Wan, E. Khor, G. W. Hastings // *J Biomed Mater Res*. – 1997. – Vol. 38. – P. 235–241.
55. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera): Part I. Isolation and identification of chitin / H. Ehrlich, M. Ilan, M. Maldonado [et al.] // *Int J Biol Macromol*. – 2010. –Vol. 47. – P. 132–140.
56. Jeuniaux C. Chitin biomass and production in the marine environment / C. Jeuniaux, M.F. Voss-Foucart // *Biochem Syst Ecol*. – 1991. –Vol. 19. – P. 347–356.
57. Chitin based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta* / E. Brunner, H. Ehrlich, P. Schupp. [et al.] // *J Struct Biol*. – 2009. – Vol. 168. – P. 539–547.
58. Hyman LH. The occurrence of chitin in the lophophorate phyla / L. H. Hyman // *Biol Bull*. – 1958. Vol. 114. – P. 106–112.
59. Brunet P. C. J. Chitin in pogonophora / P. C. J. Brunet, D. B. Carlisle // *Nature*. – 1958. Vol. – 182. – doi:10.1038/1821689a0.
60. Blackwell J. Chitin in pogonophore tubes / J. Blackwell, K. D. Parker, K. M. Rudall // *J Mar Biol Assoc UK*. – 1965. –Vol. 45. – P.659–661.
61. Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans / K. Kurita // *Mar Biotechnol*. – 2006. – Vol. 8. – P. 203–226.
62. Lavall R. L. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp. extraction and characterization / R. L. Lavall, O. Assis, S. P. Campana-Filho // *Bioresour Technol*. – 2007. –Vol. 98. – P. 2465–2472.

63. Mathur N. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals / N. K. Mathur, C . K. Narang // *J Chem Educ.* – 1990. – Vol. 67. – P. 938–942.
64. Tweedie E. P. Purification of a soluble gly- coprotein from the uncalcified ecdysial cuticle of the blue crab *Callinectes sapidus* and its possible role in initial mineralization / E. P. Tweedie, F. E. Coblentz, T. H. Shafer // *J Exp Biol.* – 2004. – Vol. 207. – P. 2589–2598.
65. Recovery of astaxanthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste / P. Stepnowski, G. Olafsson, H. Helgason [et al.] // *Chemosphere.* – 2004. – Vol. 54. –P. 413–417.
66. Optimum parameters for production of chitin and chitosan from *Squilla* (*S. empusa*) / M. S. Rao, K. A. Nyein, T. S. Trung [et. al.] // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2007. – Vol. 103. – P. 3453–4115.
67. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan – Part A: extraction methods / M. Hayes, B. Carney, J. Slater [et. al.] // *Biotechnol J.* – 2008. – Vol. 3. – P. 871–877.
68. Palpandi C. Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod *Nerita* (*Dostia*) *crepidularia* Lamarck / C. Palpandi, V. Shanmugam, A. Shanmugam // *Int. J. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 1. – P. 198–205.
69. Sacco L. D. Chitin and chitosan as multipurpose natural polymers for groundwater arsenic removal and AS₂O₃ delivery in tumor therapy / L. D. Sacco, A. Masotti // *Mar Drugs.* – 2010. – Vol 8. – P. 1518–1525.
70. Khoushab F. Chitin research revisited / F. Khoushab, M. Yamabhai // *Mar Drugs.* – 2010. – Vol 8. – P. 1988–2012.
71. Preparation, characterization, bioactive and cell attachment studies of a chitin/gelatin composite membranes / H. Nagahama, R. V. Divya, K. T. Shalumon [et. al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2009. – Vol 44. – P. 333–337.
72. Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel / H. Nagahama, H. Maeda, T. Kashiki [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2009. – Vol. 76. – P. 255–260.

73. Domard A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan / A. Domard // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – Vol. 84. – P. 696–703.
74. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan–poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel / C. T. Tsao, C. H. Chang, Y. Y. Lin [et. al.] // *CarbohydrRes.* – 2010. – Vol. 345. – P. 1774–1780.
75. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review / M. Kong, X. G. Chen, K. Xing [et. al.] // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 144. – P. 51–63.
76. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits / P. R. Klokkevold, H. Fukayama, E. C. Sung [et. al.] // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* – 1999. – Vol. 57. – P. 49-52.
77. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier / R. Rosenthal, D. Günzel, C. Finger [et. al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33 (9). – P. 2791-800.
78. Preparation and function of composite asymmetric chitosan/CM-chitosan membrane / H. T. Pang, X. G. Chen, Q. X. Ji [et. al.] // *J. MaterSci. Mater. Med.* – 2008. – Vol. 19. – P. 1413–1417.
79. Sivakumara M. Preparation, characterization and in-vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–chitosan composite microspheres / M. Sivakumara, I. Manjubalab, K. Panduranga Raoa. // *Carbohydrate Polymers.* – 2002. – Vol. 49. – P. 281–288.
80. Pangburn S. H. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels / S. H. Pangburn, P. V. Trescony, J. Heller // *Biomaterials.* – 1982. – Vol. 3 (2). – P. 105-108.
81. Sashiwa H. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials / H. Sashiwa, S. Aiba // *Prog. Polym. Sci.* – 2004. – Vol. 29. – P. 887–888.
82. Krayukhina M. A. Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications / M. A. Krayukhina, N. A. Samoilova, I. A. Yamskov // *Russ. Chem. Rev.* – 2008. – Vol. 77 (9). – P. 799–813.

83. Chitosan a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications / M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite [et. al.] // *Prog. Polym. Sci.* – 2011. – Vol. 36. – P. 981–1014.
84. Jang J. H. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering / J. H. Jang, O. Castano, H. W. Kim // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2009. – Vol. 61. – P. 1065–1083.
85. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering / B. S. Kim, I. K. Park, T. Hoshiba [et. al.] // *Prog. Polym. Sci.* – 2011. – Vol. 36. – P. 238–268.
86. Martino A. D. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. D. Martino, M. Sittinger, M. V. Risbud // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 5983–5990.
87. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering / Z. Li, H. R. Ramay, K. D. Hauch [et. al.] // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 3919–3928.
88. Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering / W. I. Abdel-Fattah, T. Jiang, G. T. El-Bassyouni [et.al.] // *Acta Biomater.* – 2007. – Vol. 3. – P. 503–514.
89. Chitosan–poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: in vitro degradation and in vivo bone regeneration studies / T. Jiang, S. P. Nukavarapu, M. Dengn [et. al.] // *Acta Biomater.* – 2010. – Vol. 6. – P. 3457–3470.
90. RGD-conjugated UV-crosslinked chitosan scaffolds inoculated with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering / W. B. Tsai, Y. R. Chen, W. T. Li [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – Vol. 89. – P. 379–387.
91. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering / P. Yilgor, K. Tuzlakoglu, R. L. Reis [et. al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30. – P. 3551–3559.
92. Response of rat osteoblasts to polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds / H. Wu, Y. Wan, S. Dalai [et. al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2010. – Vol. 92. – P. 238–245.

93. Biodegradable polycaprolactone-chitosan three-dimensional scaffolds fabricated by melt stretching and multilayer deposition for bone tissue engineering: assessment of the physical properties and cellular response / N. Thuaksuban, T. Nuntanaranont, W. Pattanachot [et. al.] // *Biomed. Mater.* – 2011. – Vol. 6. – doi: 10.1088.
94. Growth factor releasing porous poly(ϵ -caprolactone)–chitosan matrices for enhanced bone regenerative therapy / S. Y. Im, S. H. Cho, J. H. Hwang [et. al.] // *Arch. Pharm. Res.* – 2003. – Vol. 26. – P. 76–82.
95. RhBMP-2 microspheres-loaded chitosan/collagen scaffold enhanced osseointegration: an experiment in dog / S. Shi, X. Cheng, J. Wang [et. al.] // *J. Biomater. Appl.* – 2009. – Vol. 23. – P. 331–346.
96. Gumusderelioglu M. Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering / M. Gumusderelioglu, S. Aday // *Carbohydr. Res.* – 2011. – Vol. 346. – P. 606–613.
97. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on melt based chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications / A. R. Costa-Pinto, V. M. Correlo, P. C. Sol [et. al.] // *Biomacromolecules.* – 2009. – Vol. 10. – P. 2067–2073.
98. Mano J. F. Bioactive poly(l-lactic acid)–chitosan hybrid scaffolds / J. F. Mano, G. Hungerford, L. Ribelles // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2008. – Vol. 28. – P. 1356–1365.
99. Glimcher M. J. Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation / M. J. Glimcher // *Rev. Miner. Geochem.* – 2006. – Vol. 64. – P. 223–282.
100. Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nanomaterials / C. Chang, N. Peng, M. He [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 91. – P. 7–13.
101. Synthesis, characterization and cytocompatibility studies of α -chitin hydrogel/nano hydroxyapatite composite scaffolds / P. T. Sudheesh Kumar, S. Sowmya, L. Vinoth Kumar [et. al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2011. – Vol. 49. – P. 20–31.

102. β -Chitin hydrogel/nano hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications / P. T. Sudheesh Kumar, S. Sowmya, L. Vinoth Kumar [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – Vol. 85. – P. 584–591.

103. Li X. In vitro degradation of porous nano-hydroxyapatite/collagen/PLLA scaffold reinforced by chitin fibres / X. Li, Q. Feng, F. Cui // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2006. – Vol. 26. – P. 716–720.

104. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering / M. E. Frohbergh, A. Katsman, G. P. Botta [et. al.] // *Biomaterials.* – 2012/ – Vol. 33. – P. 9167–9178.

105. Preparation and characterization of homogeneous chitosan–polylactic acid/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties / X. Cai, H. Tong, X. Shen [et. al.] // *J. Acta. Biomater.* – 2009. – 5. – P. 2693–2703.

106. Wang L. Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite / L. Wang, C. Li // *Carbohydr. Polym.* – 2007. – Vol. 68. – P. 740–745.

107. Preparation and properties of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose composite scaffold / L. Jiang, Y. Li, X. Wang [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2008. – Vol. 74. – P. 680–684.

108. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan-natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering / J. Venkatesan, Z. J. Qian, B. Ryu [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2011/ – Vol. 83. – P. 569–577.

109. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan–gelatin network composite scaffolds / F. Zhao, Y. Yin, W. W. Lu [et. al.] // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 3227–3234.

110. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes / Z. Ge, S. Baguenard, L. Y. Lim [et. al.] // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 1049–1058.

111. Biocompatible β -chitin Hydrogel/Nanobioactive Glass Ceramic Nanocomposite Scaffolds for Periodontal Bone Regeneration / S. Sowmya, P. T.

Sudheesh Kumar, K. P. Chennazhi [et. al.] // Trends Biomater. Artif. Organs. – 2011. – Vol. 25. – P. 1–11.

112. Bonding mechanism at interface of ceramic prosthetic materials / L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen [et. al.] // J. Biomed Mater. Res. Symp. – 1971. – 2. – P. 117–141.

113. Jones J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids / J. R. Jones // Acta. Biomater. – 2013. – Vol. 9. – P. 4457–4486.

114. Tyagi S. Development and in vitro characterization of melt quench derived silica based bioglasses / S. Tyagi, K. Singh // Processing and fabrication of advanced materials XVII International Publishing House Pvt. Ltd. – 2009. – Vol. 2. – P. 830–844.

115. Antibacterial and bioactive alpha- and beta-chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic/nano silver composite scaffolds for periodontal regeneration / S. Sowmya, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair [et. al.] // J. Biomed. Nanotechnol. – 2013. – Vol. 9. – P. 1803–1816.

116. Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications / M. Peter, N. S. Binulal, S. Soumya [et. al.] // Carbohydr. Polym. – 2010. – Vol. 79. – P. 284–289.

117. Chitosan membranes containing micro or nano-size bioactive glass particles: evolution of biomineralization followed by in situ dynamic mechanical analysis / S. G. Caridade, E. G. Merino, N. M. Alves [et. al.] // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2013. – Vol. 20. – P. 173–183.

118. Effect of incorporation of nanoscale bioactive glass and hydroxyapatite in PCL/chitosan nanofibers for bone and periodontal tissue engineering / K. T. Shalumon, S. Sowmya, D. Sathish [et. al.] // J. Biomed. Nanotechnol. – 2013. – Vol. 9. – P. 430–440.

119. Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering / M. Peter, N. S. Binulal, S. V. Nair [et. al.] // Chem. Eng. J. – 2010. – Vol. 158. – P. 353–361.

120. Mansur H. S. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical

applications / H. S. Mansur, H. S. Costa // *Chem. Eng. J.* – 2008. – Vol. 137. – P. 72–83.

121. Study on surface modification of porous apatite–wollastonite bioactive glass ceramic scaffold / B. Cao, D. Zhou, M. Xue [et. al.] // *Appl. Surf. Sci.* – 2008. – Vol. 255. – P. 505–508.

122. Chitosan (PEO)/silica hybrid nanofibers as a potential biomaterial for bone regeneration / G. Toskas, C. Cherif, R. D. Hund [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 94. – P. 713–722.

123. In vitro study of the SBF and osteoblast-like cells on hydroxyapatite/chitosan–silica nanocomposite / P. Jongwattanapisan, N. Charoenphandhu, N. Krishnamra [et. al.] // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2011. – Vol. 31. – P. 290–299.

124. Novel chitin/nanosilica composite scaffolds for bone tissue engineering applications / K. Madhumathi, P. T. Sudheesh Kumar, K. C. Kavya [et. al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2009. – Vol. 45. – P. 289–292.

125. Mohamed K. R. Preparation and bioactivity evaluation of hydroxyapatite–titania/chitosan gelatin polymeric biocomposites / K. R. Mohamed, A. A. Mostafa // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2008. – Vol. 28. – P. 1087–1099.

126. Fabrication of chitin–chitosan/nano TiO₂-composite scaffolds for tissue engineering applications / R. Jayakumar, R. Ramachandran, V. V. Divyarani [et. al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2011. – Vol. 48. – P. 336–344.

127. Extreme biomimetics: formation of zirconium dioxide nanophase using chitinous scaffolds under hydrothermal conditions / H. Ehrlich, P. Simon, M. Motylenko [et al.] // *J Mater Chem B.* – 2013. – Vol. 1. – P. 5092–5099.

128. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering / D. J. Griffon, M. R. Sedighi, D. V. Schaeffer [et al.] // *Acta Biomater.* – 2006. – Vol. 2. – P. 313–320.

129. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: implications for cartilage tissue engineering / S. E. Kim, J. H. Park, J. C. Cho [et al.] // *J Controlled Release.* – 2003. – Vol. 91. P. 365–374.

130. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications / L. P. Yan, Y. J. Wang, L. Ren [et al.] // *J Biomed Mater Res A*. – 2010. – Vol. 95. – P. 465–475.

131. Kuo Y. C., Cartilage regeneration by novel polyethylene oxide/chitin/chitosan scaffolds / Y. C. Kuo, I. N. Ku. // *Biomacromolecules*. – 2008. – Vol. 9. – P. 2662–2269.

132. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels / T. Hao, N. Wen, J. K. Cao [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2010. – Vol. 18. – P. 257–265.

133. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering / H. Park, B. Choi, J. Hu [et al.] // *Acta Biomater*. – 2013. – Vol. 9. – P. 4779–4786.

134. Nanostructured 3D constructs based on chitosan and chondroitin sulphate multilayers for cartilage tissue engineering / J. M. Silva, N. Geogi, R. Costa [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – P. 1–11.

135. Effect of pore size on in vitro cartilage formation using chitosan-based hyaluronic acid hybrid polymer fibers / S. Yamane, N. Iwasaki, Y. Kasahara [et al.] // *J Biomed Mater Res A*. – 2007. Vol. 81. – P. 586–593.

136. Development of mature cartilage constructs using novel three-dimensional porous scaffolds for enhanced repair of osteochondral defects / Y. Kasahara, N. Iwasaki, S. Yamane [et al.] // *J Biomed Mater Res A*. – 2008. – Vol. 86. – P. 127–136.

137. Chitosan/poly(s-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair / S. C. Neves, L. S. M. Teixeira, L. Moroni [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 1068–1079.

138. Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads / V. Kishore, W. Bullock, X. Sun [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – P. 2137–244.

139. Tendon tissue engineering: progress, challenges, and translation to the clinic / J. T. Shearn, K. R. C Kinneberg, N. A. Dyment [et al.] *J Musculoskelet Neuronal Interact*. – 2011. – Vol. 11. – P. 163–173.

140. Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering / T. Majima, T. Funakosi, N. Iwasaki [et al.] // *J Orthop Sci.* – 2005. Vol. 10. – P. 302–307.

141. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering / T. Funakosi, T. Majima, N. Iwasaki [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2005. – Vol. 74. – P. 338–346.

142. Biomechanical and histologic evaluation of tissue engineered ligaments using chitosan and hyaluronan hybrid polymer fibers: a rabbit medial collateral ligament reconstruction model / T. Irie, T. Majima, N. Sawaguchi [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2011. – Vol. 97. – P. 111–117.

143. Rotator cuff regeneration using chitin fabric as an acellular matrix / T. Funakoshi, T. Majima, N. Suenaga [et al.] // *J Shoulder Elbow Surg.* – 2006. – Vol. 15. P. 112–118.

144. Reconstruction of rabbit Achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies / M. Sato, M. Maeda, H. Kurosawa [et al.] // *J Orthop Sci.* – 2000. – Vol. 5. – P. 256–267.

145. Chitosan microchannel scaffolds for tendon tissue engineering characterized using optical coherence tomography / P. O. Bagnaninchi, Y. Yang, N. Zghoul [et al.] // *Tissue Eng.* 2007. – Vol. 13. – P. 323–331.

146. Design and characterization of a biodegradable composite scaffold for ligament tissue engineering / J. W. S Hayami, D. C. Surrao, S. D. Waldman [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2010. – Vol. 92. – P. 1407–1420.

147. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / T. W. Cho, Y. N. Cho, S. H. [et al.] // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20. – P. 2139–2145.

148. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human fetal dermal fibroblasts / J. Ma, H. Wang, B. [et. Al.] // *Biomaterials.* – 2001. – Vol. 22. – P. 331–336.

149. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs / H. Ueno, H. Yamada, I. Tanaka [et al.] // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20. – P. 1407–1414.

150. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice / K. Mizuno, K. Yamamura, K. Yano [et al.] // *J Biomed Mater Res A*. – 2003. – Vol. 64. – P. 177–181.
151. Yan X. L. PEC films prepared from chitosan alginate coacervates / X. L. Yan, E. Khor, L. Y. Lim // *Chem Pharm Bull*. – 2000. – Vol. 48. – P. 941–946.
152. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: assessment of incisional wound healing / L. S. Wang, E. Khor, A. Wee, L. Y. [et al.] // *J Biomed Mater Res*. – 2002. Vol. 63. – P. 610–618.
153. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering / L. Ma, C. Gao, Z. Mao [et al.] // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 4833–4841.
154. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and non-infected wounds in mice / M. Burkatovskaya, A. P. Castano, T. N. Demidova-Rice [et al.] // *Wound Repair Regen*. – 2008. – Vol. 16. – P. 425–431.
155. The healing of full-thickness burns treated by using plasmid DNA encoding VEGF-165 activated collagen–chitosan dermal equivalents / R. Guo, S. Xu, L. Ma, A. Huang [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P.1019–1031.
156. Biopolymer gel matrix as acellular scaffold for enhanced dermal tissue regeneration / R. Judith, M. Nithya, C. Rose [et al.] // *Biologicals*. – 2012. – Vol. 40. – P. 231–329.
157. Preparation and characterization of collagen–chitosan–chondroitin sulfate composite membranes / W .Kangjian, D .Nianhua, X .Shiwei [et al.] // *J Membr Biol*.– 2012. – Vol. 245. – P. 707–716.
158. Characterization of chitosan–gelatin scaffolds for dermal tissue engineering / H. J. Tseng, T. L. Tsou, H. J. Wang [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2013. – Vol. 7. – P. 20–31.
159. Antibacterial and bioactive α -and β -chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic/nano silver composite scaffolds for periodontal regeneration / S. Sowmya, P. T. Kumar, V. Sreeja [et al.] // *Journal of biomedical nanotechnology*. – 2013. – Vol. 9. – P. 1803–1816.

160. Lai H. L. The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges / H. L. Lai, A. Abu'Khalil, D. Q. Craig // *Int J Pharm.* – 2003. – Vol. 251(1-2) – P. 175–181.

161. Lin H. Y. Alginate-crosslinked chitosan scaffolds as pentoxifylline delivery carriers / H. Y. Lin, C. T. Yeh // *J Mater Sci Mater Med.* – 2010. – Vol. 21 (5). – P. 1611–1620.

162. Fabrication of n-HA/CSporous scaffold carrying ampicillin-loaded microspheres / P. J. Shi, Y. B. Li, L. Zhang [et al.] // *Mater SciForum.* – 2007. – Vol. 544/545. – P. 941–944.

163. Duarte A. R. C. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology / A. R. C Duarte, J. F. Mano, R. L. Reis // *Eur Polym J.* – 2009. – Vol. 45. – P. 141–148.

164. Functionally gradient chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug release / S. H. Teng, E. J. Lee, P. Wang [et al.] // *J Biomed Mater Res B.* – 2010. – Vol. 90. – P. 275–282.

165. Chitosan sponges to locally deliver amikacin and vancomycin a pilot in vitro evaluation / S. P. Noel, H. S. Courtney, J. D. Bumgardner [et al.] // *Clin Orthop Relat Res.* – 2010. – Vol. 468. – P. 2074–2080.

166. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid)–chitosan hybrid scaffolds with drug release capability / M. Prabakaran, M. A. Rodriguez-Perez, J. A. Saja [et al.] // *J Biomed Mater Res B.* – 2007. – Vol. 81. – P. 427–434.

167. Lin H. Y. Modifications of alginate-based scaffolds and characterizations of their pentoxifylline release properties / H. Y. Lin, S. Y. Ciou // *Carbo hydr Polym.* – 2010. – Vol. 80. – P. 574–580.

168. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold / Z. X. Meng, W. Zheng, L Li [et al.] // *Mater Chem Phys.* – 2011. – Vol. 125. – P. :606–611.

169. Thacharodi D. Collagen-chitosan composite membranes controlled transdermal delivery of nifedipine and propranololhydrochloride / D. Thacharodi, K. P. Rao // *Int J Pharm.* – 1996. – Vol. 134. – P. 239–241.

170. Ganji F. Chitosan-g-PLGA copolymer as a thermosensitive membrane / F. Ganji, M. J. Abdekhodaie // *Carbohydr Polym.* – 2010. – Vol. 80. – P. 740–746.
171. Li F. Preparation of oxidized glucose-cross linked N-alkylated chitosan membrane and in vitro studies of pH-sensitive drug delivery behavior / F. Li, W. G. Liu, K. D. Yao // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 343–347.
172. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin / F. L. Mi, Y. C. Tan, H. C. Liang [et al.] // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2001. – Vol. 12. – P. 835–850.
173. A novel pH sensitive membrane from chitosan: preparation and its drug permeation characteristics / S. B. Park, J. O. You, H. Y. Park [et al.] // *Biomaterials.* – 2001. – Vol. 22. – P. 323–330.
174. Ke G. Preparation and properties of drug loaded chitosan–sodium alginate complex membrane / G. Ke, W. Xu, W. Yu // *Int J Polym Mater.* – 2010. – Vol. 59. – P. 184–191.
175. Thacharodi D. Propranolol hydrochloride release behavior of cross linked chitosan membranes / D. Thacharodi, K. P. Rao. // *J Chem Technol Biotechnol.* – 1993. – Vol. 58. – P. 177–181.
176. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery / S. Senel, G. Ikinici, S. Kas [et al.] // *Int J Pharm.* – 2000. – Vol. 193. – P. 197–203.
177. Design and evaluation of chitosan/ethyl cellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery / C. R. Lopez, A. Portero, J. L. Vila-Jato [et al.] // *J Controlled Release.* – 1998. – Vol. 55. – P. 143–152.
178. Kennedy JF. Chitosan/organic rectorite nanocomposite films: structure, characteristic and drug delivery behavior / X. Wang, Y. Du, J. Luo [et al.] // *Carbohydr Polym.* – 2007. – Vol. 69. – P. 41–49.
179. In vitro release of dexamethasone or bFGF from chitosan/hydroxyapatite scaffolds / R. S. Tigli, A. C. Akman [et al.] // *J Biomater Sci Polym E.* – 2009. – Vol. 20. – P. 1899–1914.

180. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration / B. De la Riva, E. Sánchez, A. Hernández [et al.] // *J Controlled Release*. – 2010. – Vol. 143. – P. 45–52.

181. In vitro evaluation of dual growth factor-incorporated chitosan nanoparticle impregnated collagen–chitosan scaffold for tissue engineering / A. M. Rajam, P. Jithendra, C. Rose [et al.] // *J BioactCompat Polym*. – 2012. – Vol. 27. – P. 265–277.

182. Lin H. Y. Controlled release of pentoxifylline from porous chitosan–pectin scaffolds / H. Y. Lin, C. T. Yeh // *Drug Deliv*. – 2010. – Vol. 17. – P. 313–321.

183. Denkbas E. B. Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning / E. B. Denkbas, M. Seyyal, E. P. Kin // *J Membr Sci*. – 2000. – Vol. 172. – P. 33–38.

184. Lin HY Controlled release of pentoxifylline from porous chitosan–pectin scaffolds / H. Y. Lin, C. T. Yeh. // *Drug Deliv*. – 2010. – Vol. 17. – P. 313–321.

185. The effect of insulin-loaded chitosan particle-aggregated scaffolds in chondrogenic differentiation / P. B. Malafaya, J. T. Oliveira, R. L. Reis [et al.] // *Tissue Eng A*. – 2010. – Vol. 16. – P. 735–747.

186. Singh R. Chitin membrane for wound dressing application–preparation, characterisation and toxicological evaluation / R. Singh, M. P. Chacharkar, A. K. Mathur // *Int Wound J*. – 2008. – Vol. 5. – P. 665–673.

187. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application / A. K. Azad, N. Sermsintham, S. Chandrkrachang [et al.] // *J Biomed Mater Res B*. – 2004. – Vol. 69. – P. 216–222.

188. In vivo performance of chitosan/soy-based membranes as wound dressing devices for acute skin wounds / T. C. Santos, B. Hoering, K. Reise [et al.] // *Tissue Eng A*. – 2013. – Vol. 19. – P. 860–869.

189. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: anew type of wound dressing for controlled antibacterial release / L. M. Fwu, B. W. Yu, S. S. Shin [et al.] // *J Membr Sci*. – 2003. – Vol. 212. – P. 237–254.

190. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application / X. Meng, F. Tian, J. Yang [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2010. – Vol. 21. – P. 1751–1759.

191. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery / F. L. Mi, Y. B. Wu, S. S. Shyu [et al.] // *J Biomed Mater Res.* – 2002. – Vol. 59. – P. 438–449.

192. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings / P. R. Marreco, P. Luz Moreira, S. C. Genari [et al.] *J Biomed Mater Res B.* – 2004. – Vol. 71. – P. 268–277.

193. Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro / X. Zhu, K. S. Chian, M. B. Chan-Park [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2005. – Vol. 73. – P. 264–274.

194. Development of new hydro active dressings based on chitosan membranes: characterization and in vivo behavior / A. A. De Queiroz, H. G. Ferraz, Abraham GA [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2003. – Vol. 64. – P. 147–154.

195. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing / F. L. Mi, S. S. Shyu, Y. B. Wu [et al.] // *Biomaterials.* – 2001. – Vol. 22. – P. 165–73.

196. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings / W. Tao, K. Z. Xiao, T. X. Xu [et al.] // *Carbohydr Polym.* – 2012. – Vol. 88. – P. 75–83.

197. Beta-chitin-based wound dressing containing silver sulfur diazine / Y. M. Lee, S. S. Kim, M. H. Park [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2000. – Vol. 11. – P. 817–823.

198. Development of novel chitin/nano silver composite scaffolds for wound dressing applications / K. Madhumathi, P. T. Sudheesh Kumar, S. Abilash [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2010. – Vol. 21. – P. 807–813.

199. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. / M. Chen, Z. Yang, H. Wu [et al.] // *Int J Nanomed.* – 2011. – Vol. 6. – P. 2873–2877.

200. Studies on gelatin-based sponges: Part III. A comparative study of crosslinked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat / Y. S. Choi, S. B. Lee, S. R. Hong [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2001. – Vol. 12. – P. 67–73.
201. Flexible and micro-porous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: in vitro and in vivo evaluation / P. T. Sudheesh Kumar, V. K. Lakshmanan [et al.] // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2012. – Vol. 4. – P. 2618–2629.
202. Synthesis and biological evaluation of chitin hydrogel/nanoZnO composite bandage as antibacterial wound dressing / P. T. Sudheesh Kumar, V. K. Lakshmanan, R. Biswas [et al.] // *J Biomed Nanotechnol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 1–10.
203. Evaluation of wound healing potential of β -chitin hydrogel/nano zinc oxide composite bandage / P. T. Sudheesh Kumar, V. K. Lakshmanan, R. Mincy [et al.] // *Pharm Res.* – 2013. – Vol. 30. – P. 523–537.
204. Synthesis of GTMAC modified chitin–PAA gel and evaluation of its biological properties // P. Uppanan, S. Channasanon, S. Veeranondh [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2011. – Vol. 98. P. 185–191.
205. Efficacy of chitin–PAA–GTMAC gel in promoting woundhealing: animal study / P. Kajee, M. Patamaporn, S. Duangkamol [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2011. – Vol. 22. – P. 2497–2504.
206. Wound dressing with sustained anti-microbial capability / W. K. Loke, S. K. Lau, L. L. Yong [et al.] // *J Biomed Mater Res.* – 2000. – Vol. 53. – P. 8–17.
207. Release characteristic and stability of curcumin incorporated in β -chitin non-woven fibrous sheet using Tween 20 as an emulsifier / P. Ratanajajaroen, W. Anyarat, H. Tamura [et al.] // *Eur Polym J.* – 2012. – Vol. 48. – P. 512–523.
208. In vivo evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxy poly(ethyleneglycol)-graft-chitosan composite film for wound healing application / L. Xingyi, N. Kaihui, L. Lingli [et al.] // *Carbohydr Polym.* – 2012. Vol. 88. – P. 84–90.

209. Seong S. K. Synthesis and properties of semiinterpenetrating polymer networks composed of β -chitin and poly(ethylene glycol) macromere / S. K. Seong, M. L. Young. // *Polymer*. – 1995. – Vol. 36. – P. 4497–4501.

210. Comparative study between chitin/polyacrylic acid (PAA) dressing, lipido-colloid absorbent dressing and alginate wound dressing: a pilot study in the treatment of partial-thickness wound / A. Angspatt, P. Tanvatcharaphan, S. Channasanon [et al.] // *J Med Assoc Thai*. – 2010. Vol. 93. – P. 694–697.

211. Development of N,O-(carboxymethyl) chitosan/collagen matrixes as a wound dressing / R. N. Chen, G. M. Wang, C. H. Chen [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2006. – Vol. 7. – P. 1058–1064.

212. Gel characterization and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan / J. H. Sung, M. R. Hwang, J. O. Kim [et al.] // *Int J Pharm*. – 2010. – Vol. 392. – P. 232–240.

213. A novel in situ-formed hydrogel wound dressing by the photocross-linking of a chitosan derivative / G. Lu, K. Ling, P. Zhao [et al.] // *Wound Repair Regen*. – 2010. – Vol. 18. – P. 70–79.

214. Rattanatayarom W. Evaluation of dermal irritancy potential of carboxymethyl-chitosan hydrogel and poly(acrylic acid) chitin hydrogel / W. Rattanatayarom, S. Wattanasirichaigoon // *J Med Assoc Thai*. – 2007. – Vol. 90. – P. 724–729.

215. Liu Y. Characterization and antibacterial properties of genipin cross linked chitosan/poly (ethylene glycol) /ZnO/ Ag nanocomposites / Y. Liu, H.I. Kim // *Carbohydr Polym*. – 2012. – Vol. 89. – P. 111–116.

216. Mechanical enhancement of nanofibrous scaffolds through polyelectrolyte complexation J. Xu, N. Cai, W. Xu [et al.] // *Nanotechnology*. – 2013. – Vol. 24. – doi: 10.1088/0957-4484/24/2/025701.

217. Chen J. P. Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics / J. P. Chen, K. Chang, W. L. Lee // *Appl Surf Sci*. – 2012. – Vol. 262. – P. 95–101.

218. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action / M. B. Dowling, R. Kumar, M. A. Keibler [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 3351–3357.

219. Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: physical and antibacterial properties / D. A. Hashemi, H. Mirzadeh, M. Imani, [et al.] // *Carbohydr Polym*. – 2013. – Vol. 92. – P. 48–56.

220. In vitro and in vivo evaluation of microporous chitosan hydrogel/nanofibrin composite bandage for skin tissue regeneration / P. T. Sudheesh Kumar, N. M. Raj, G. Praveen [et al.] // *Tissue Eng A*. – 2013. – Vol. 19. – P. 380–392.

221. Fibrin nanoconstructs: a novel processing method and their use as drug delivery agents / G. Praveen, P. R. Sreerekha, D. Menon [et al.] // *Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 23 (9). – doi: 10.1088/0957-4484/23/9/095102.

222. Chitosan–hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use / B. S. Anisha, S. Deepthi, M. Annapoorna [et al.] // *Carbohydr Polym*. – 2013. Vol. 92. – P. 1470–1476.

223. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film / T. Tanabe, N. Okitsu, A. Tachibana [et al.] // *Biomaterials*. – 2002. – Vol. 23. – P. 817–825.

224. Accelerated wound healing by Smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate polyelectrolyte complex / H. J. Hong, S. E. Jin, J. S. Park, [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – P. 4831–4837.

225. Biochemical properties of *Hemigrapsus alternata* incorporated chitosan hydrogel scaffold / M. Annapoorna, P. T. Sudheesh Kumar, R. L. Lakshmi [et al.] // *Carbohydr Polym*. – 2013. – Vol. 92. – P. 1561–1565.

226. Матеріали для лікування дефектів шкіри: перспективи застосування похідних хітозану / М. В. Погорелов, В. В. Корнієнко, Ю. А. Ткаченко [та ін.] // *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. – 2013. – Т. 1, № 3. – С. 275 – 285.

227. Пат. № 91169 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованої травми шкіри з руйнуванням всіх її шарів в умовах

експерименту на лабораторних тваринах / Олешко О. М., Корнієнко В. В., Ткаченко Ю. А. [та ін.] ; патентовласник Сумський державний університет. – № у 2014 00251 ; заявл. 13.01.14 ; опубл. 25.06.14, Бюл. № 12.

228. Особливості цитологічної картини поверхні опікової рани при використанні хітозанових плівок / В. В. Корнієнко, О. В. Калінкевич, В. Н. Дейнека [та ін.] // Український медичний альманах. – 2013. – Т. 16, № 3. – С. 65–69.

229. Пат. № 89985 Україна, МПК G09В 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованого термічного опіку шкіри лабораторним щурам / Олешко О. М., Корнієнко В. В., Ткаченко Ю. А. [та ін.] ; патентовласник Сумський державний університет. – № у 2013 13489 ; заявл. 20.11.13 ; опубл. 12.05.14, Бюл. № 9.

230. Моделирование дефектов кожи у экспериментальных животных / А. Н. Олешко, В. В. Корниенко, Ю. А. Ткаченко [и др.] // Georgian Medical News. – 2015. – № 2 (239). – С. 103 – 108.

231. Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration / S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, H. Brancal [et al.] // Carbohydr Polym. – 2014. – Vol. 111. – P. 366–373.

232. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differential towards the osteoblast lineage / R. Olivares-Navarrete, S. L. Hyzy, D. L. Hutton [et al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31 (10). – P. 2728–2735.

233. Micro/nanostructural porous surface on titanium and bioactivity / L. Gao, B. Feng, J. X. Wang [et al.] // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2009. – Vol. 89 (2). – P. 335–341.

234. The accelerating effect of chitosan-silica hybrid dressing materials on the early phase of wound healing / J. U. Park, H. D. Jung, E. H. Song [et al.] // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2016. –. doi: 10.1002/jbm.b.33711.

235. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application / P. Chandika, S. C. Ko, G. W. Oh, [et al.] // Int J Biol Macromol. – 2015. – Vol. 81. – P. 504–513.

236. Characterization of a Thermoresponsive Chitosan Derivative as a Potential Draw Solute for Forward Osmosis / R. L. Lecaros, Z. C. Syu, Y. H. Chiao [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 50 (21). – P. 11935–11942

237. Effect of apatite formation of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) on osteoblastogenesis using simulated body fluid (SBF) with or without bovine serum albumin (BSA) / L. Huang, B. Zhou, Huayu W. [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2017. – doi: 10.1016. – P. 955–961.

238. Pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation of a thermosensitive chitosan based hydrogel containing liposomal doxorubicin / S. Ren, Y. Dai, C. Li [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2016. – Vol. 92. – P. 137–145.

239. The chitin-binding domain of a GH-18 chitinase from *Vibrio harveyi* is crucial for chitin-chitinase interactions / W. Sugintaa, P. Sirimontreea, N. Srithoa [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2016 – Vol. 93 (Pt A). – P. 1111–1117 .

240. Preparation and characterization of high purity β -chitin from squid pens (*Loligo chinesis*) / H. N. Cuong, N. C. Minh, N. Van Hoa [et al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2016. – Vol. – 93 (Pt A). – P. 442–447.

241. Naqvi S. The cell factory approach toward biotechnological production of high-value chitosan oligomers and their derivatives: an update / S. Naqvi, B. M. Moerschbacher // *Crit Rev Biotechnol.* – 2015. – Vol. 2. – P. 1–15.

242. Non-toxic O-quaternized chitosan materials with better water solubility and antimicrobial function / Chun-Hua Wang, Wen-Shuai Liu, Ju-Feng Sun [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2016 – Vol. 84 – P. 418 – 427.

243. Oleshko A. N. Age Futures of Wound Treatment With Chitosan Films Application / A. N. Oleshko // *European Journal of Medicine.* – 2014. – Vol. 4 № 2. – P. – 87–100.

244. Корнієнко В. В. Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових плівок у тварин старечого віку / В. В. Корнієнко, О.

М. Олешко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 1 (113). – С. 275–278.

245. Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових мембран в різні вікові періоди / В. В. Корнієнко, О. В. Калінкевич, М. В. Погорелов [та ін.] // Морфологія. – 2013. – Т. 7, № 4. – С. 42–50.

246. Клітинна характеристика ранової поверхні при застосуванні хітозану для лікування ран різної етіології / Ю. А. Ткаченко, О. М. Олешко, В. М. Дейнека, М. В. Погорелов // Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 10–12 квітня 2013 р. : тези доп. – Суми, 2013. – С. 23–24.

247. Спосіб моделювання гнійної рани в експерименті на лабораторних тваринах / В. М. Дейнека, Т. В. Івахнюк, О. М. Олешко [та ін.] // Актуальні питання сучасної медицини: Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених, присвячена 20-річчю медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 18–19 квітня 2013 р. : тези доп. – Харків, 2013. – С. 98.

248. Використання хітозану для лікування пошкоджень різної етіології / М. В. Погорелов, О. В. Калінкевич, О. В. Солодовник [та ін.] // Таврійський медико-біологічний вісник. – 2013. – Т. 16, № 1, ч. 2 (61). – С. 150–154.

249. Oleshko A. N. Cell Compound of Wound Surface After the Chitosan Membranes Application / A. N. Oleshko // European Journal of Medicine. Series B. – 2014. – Vol. 1 № 1. – P. – 27–44.

250. Oleshko O.M. New experimental model for studying skin injuries on rats / O.M. Oleshko // FOLICA MEDICA: 6th International Student Medical Congress 25th – 27th of June 2014.: Abstract book. – Košice P. – 129.

251. Oleshko O. M. New experimental model for studying the skin defects of different etiology on laboratory rats / O. M. Oleshko // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини: II міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 16–18 квітня 2014 р.: тези доп. – Суми, 2014. – С. 113–114.

252. Pogorielov M. V. Cell toxicity of new chitosan films for skin replacement / M. V. Pogorielov/ O. M. Oleshko // Морфологічні дослідження –

виклики сучасності : наук.-практ. конф., 23–24 квітня 2015 року. : тези доп. – Суми, 2015. – С. 107–108.

253. Погорелов М. В. Планіметричні та морфометричні показники динаміки процесу загоєння модельованого опіку при застосуванні хітозанових мембран у тварин різних вікових груп / М. В. Погорелов, В. В. Корнієнко // *Morphologia*. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 58 – 61.

254. Napchenko A. Dinamic and static degradation of electrosoining polymers / A. Napchenko, O. Oleshko, B. Drigval // *FOLICA MEDICA: 8th International Student Medical Congress 22th – 24th of June 2016. .: Abstract book*. – Košice P. – 168.

255. Суходуб Л. Ф. Хітозан для медичного використання (огляд літератури) / Л. Ф. Суходуб / Л. Б. // *J. Clin. Exp. Med. Res.* – 2014. – Vol. 2 (2). – С. 143–152.

256. Rodero M. P. Skin wound healing modulation by macrophages / M. P. Rodero, K. Khosrotehrani // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2010. – Vol. 3 (7). – P 643–653.

257. Mosti G. Wound care in venous ulcers / G. Mosti // *Phlebology*. – 2013. –Suppl 1. – P. 79–85.

258. Gurtner G. C. Regenerative Medicine: Charting a New Course in Wound Healing / G. C. Gurtner / M. A. Chapman // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2016. – Vol. 5 (7) – P. 314–328.

259. Observation of viable alloskin vs xenoskin grafted onto subcutaneous tissue wounds after tangential excision in massive burns / H. Zuo, G. Song, W. Shi [et all.] // *Burns Trauma*. – 2016. – doi: 10.1186.

260. Material couture for wound healing and regeneration: an overview / I. P. Kaur, S. K. Sandhu, P. K. Deol [et all.] // *Curr Pharm Des.* – 2015 – Vol. 21 (12). – P. 1556–1574.

261. Jeffery S. L. The Management of Combat Wounds: The British Military Experience / S.L. Jeffery // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2016. Vol. 5 (10). – P. 464–473.

262. Nie B. Biological effects and clinical application of negative pressure wound therapy: a review / B. Nie / B. Yue // *J Wound Care*. – 2016. – Vol. 25 (11). – P. 617–626.

263. Muanprasat C. Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications / C. Muanprasat, V. Chatsudthipong // *Pharmacol Ther*. – 2016. – doi: 10.1016.

264. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan - silver nanoparticles - fluoride nanocomposites / P. L. Freire, A. J. Albuquerque, I. A. Farias [et al.] // *Int J Biol Macromol*. – 2016. – Vol. 93 (Pt A). – P. 896–903.

265. Гистогенетические основы раневого процесса. / Р. К. Данилов, В. Г. Гололобов, Б. А. Григорян [и др.] // *Материалы докладов VI Всеросс. съезда АГЭ, (Саратов, 23–26 сентября, 2009)* // *Морфология*. – 2009. – Т. 136, Вып. 4. – С. 47–48.

266. Учебное пособие по общей патологии: иммунный ответ, воспаление / А. А. Майборода, Е. Г. Кирдей, И. Ж. Семинский, Б. Н. Цибель. – М. : МЕДпресс-информ, 2006. – 112 с.

267. In Vitro Investigation of Influences of Chitosan Nanoparticles on Fluorescein Permeation into Alveolar Macrophages / S. H. Chachuli, A. Nawaz, K. Shah [et al.] // *Pharm Res*. – 2016 – Vol. – 33 (6). P. – 1497–1508.

268. Effect of poly-N-acetyl glucosamine (pGlcNAc) patch on wound healing in db/db mouse / G. Pietramaggiori, H. J. Yang, S. S. Scherer [et al.] // *J Trauma*. – 2008. – V. – 64. – P. – 803–808

269. Chitosan finishing nonwoven textiles loaded with silver and iodide for antibacterial wound dressing applications / F. Aubert-Viard, A. Martin, F. Chai [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2015. Vol. – 10 (1). – doi: 10.1088

270. Alekhin A. I. Comparative Culturing of 3T3 Swiss J2 Mouse Embryo Fibroblasts on Modified Chitosan Matrices. / A. I. Alekhin, G. P. Gaenko // *Bull Exp Biol Med*. – 2016. Vol. – 161 (3). P – 412 – 413.

271. Muzzarelli R. A. Chitin and chitosan for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone / R. A. Muzzarelli // *Carbohydr Polymer*. – 2009. – Vol. 76. – P. – 167 – 182.

272. Macro- and micro-designed chitosan-alginate scaffold architecture by three-dimensional printing and directional freezing / S. Reed, G. Lau, B. Delattre [et al.] // *Biofabrication*. – 2006 – Vol. – 8 (1). – doi: 10.1088.

273. Impact of acidity and metal ion on the antibacterial activity and mechanisms of β - and α -chitosan / Q. Bingjun, J. Jung, Y. Zhao [et al.] // *Appl Biochem Biotechnol*. – 2015 – Vol. – 175 (6). – P. 2972 – 2985.

274. Mechanistic insights into response of *Staphylococcus aureus* to bioelectric effect on polypyrrole/chitosan film / J. Zhang, K. G. Neoh, X. Hu [et al.] // *Biomaterials*. – 2014 – Vol. – 35 (27). – P. 7690 – 7698.

275. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against *Staphylococcus epidermidis* / I. S. Dragland, H. V. Rukke, I. S. Stenhagen [et al.] // *Int J Microbiol*. – 2016 – doi: 10.1155/2016/9159761.

276. The effect of chitosan on the migration of neutrophil-like HL60 cells, mediated by IL-8 / C. J. Park, N.P. Gabrielson, D.W. Pack [et al.] // *Biomaterials*. – 2009 – Vol. – 30 (4). – P. 436 – 444.

277. Evaluation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in serum and lesional skin of patients with alopecia areata / S. A. Salem, M. K. Asaad, S. B. Elsayed [et al.] // *Int. J. Dermatol*. – 2016. – Vol. – 55 (12). – P. 1357 – 1361.

ДОДАТОК А
(довідковий)

Таблиця А.1 – Планіметричні показники стану поверхні рани шкіри тварин контрольної серії різних вікових груп, $M \pm m$ (n = 6)

	Вік	Термін спостереження, днів				
		1	3	7	14	21
Загальна площа дефекту, см ²	Молодий	1,75 ± 0,28	1,65 ± 0,31	1,28 ± 0,15	0,57 ± 0,06	0
	Зрілий	1,76 ± 0,26	1,69 ± 0,29	1,36 ± 0,21	0,8 ± 0,14	0,16 ± 0,04
	Старечий	1,76 ± 0,19	1,72 ± 0,36	1,44 ± 0,29	1,0 ± 0,12	0,23 ± 0,06
Відносна площа некрозу, %	Молодий	21,28 ± 1,39	19,2 ± 1,14	6,19 ± 0,49		
	Зрілий	21,32 ± 1,33	20,01 ± 0,87	7,21 ± 0,21		
	Старечий	21,41 ± 0,91	20,39 ± 1,13	7,89 ± 0,54		
Грануляція, %	Молодий		10,12 ± 0,61	33,72 ± 1,04	16,15 ± 0,49	
	Зрілий		9,65 ± 0,73	32,12 ± 0,67	20,27 ± 1,13	
	Старечий		8,56 ± 0,65	31,03 ± 1,24	21,34 ± 0,85	
Відносна площа епітелізації, %	Молодий			7,12 ± 0,49	47,82 ± 1,24	98,71 ± 1,12
	Зрілий			3,26 ± 0,16	40,48 ± 1,03	87,16 ± 2,76
	Старечий			2,98 ± 0,33	35,16 ± 0,98	76,34 ± 2,14

Таблиця А.2 – Планіметричні показники стану поверхні рани шкіри тварин експериментальної серії різних вікових груп, $M \pm m$ ($n = 6$)

	Вік	Термін спостереження, днів				
		1	3	7	14	21
Загальна площа дефекту, см ²	Молодий	1,76 ± 0,23 p = 0,9785	1,51 ± 0,19 p = 0,7083	1,0 ± 0,16 p = 0,24	0,35 ± 0,05 p = 0,0183	
	Зрілий	1,74 ± 0,39 p = 0,9707	1,62 ± 0,17 p = 0,83	1,12 ± 0,12 p = 0,34	0,64 ± 0,04 p = 0,29	
	Старечий	1,72 ± 0,23 p = 0,8960	1,76 ± 0,21 p = 0,9254	1,24 ± 0,29 p = 0,63	0,84 ± 0,11 p = 0,34	
Відносна площа некрозу, %	Молодий	21,98 ± 1,27 p = 0,7178	16,13 ± 1,14 p = 0,08	3,71 ± 0,17 p = 0,0007		
	Зрілий	22,06 ± 1,19 p = 0,6872	18,97 ± 1,09 p = 0,4730	4,04 ± 0,29 p = 0,0001		
	Старечий	22,35 ± 1,34 p = 0,5745	19,10 ± 0,88 p = 0,38	4,22 ± 0,11 p ≤ 0,0001		
Грануляція, %	Молодий		13,21 ± 0,46 p = 0,0023	29,65 ± 1,39 p = 0,0410	12,81 ± 0,17 p ≤ 0,0001	
	Зрілий		12,47 ± 0,53 p = 0,0108	28,51 ± 0,62 p = 0,0027	15,27 ± 0,29 p = 0,0016	
	Старечий		12,02 ± 0,61 p = 0,0031	27,87 ± 0,78 p = 0,0564	17,36 ± 0,31 p = 0,0013	
Відносна площа епітелізації, %	Молодий			12,21 ± 0,17 p ≤ 0,0001	68,11 ± 1,07 p ≤ 0,0001	98,37 ± 0,71 p = 0,8028
	Зрілий			6,48 ± 0,11 p ≤ 0,0001	56,10 ± 0,54 p ≤ 0,0001	91,44 ± 1,32 p = 0,1921
	Старечий			3,95 ± 0,19 p = 0,0290	45,91 ± 1,93 p = 0,0006	88,62 ± 1,71 p = 0,0012

Таблиця А.3 – Цитологічні показники стану поверхні рани шкіри тварин контрольної серії різних вікових груп, $M \pm m$ (n = 6)

Клітинний склад	Вік	Термін спостереження, доба				
		1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Кількість лейкоцитів у полі зору	Молодий	98,3 ± 1,95	92,4 ± 2,28	24,6 ± 0,87	20,8 ± 1,21	7,65 ± 0,53
	Зрілий	103 ± 2,11	95,6 ± 2,3	28,2 ± 0,74	24,6 ± 0,97	9,2 ± 0,53
	Старечий	109,5 ± 1,02	99,5 ± 1,24	33,7 ± 0,59	25,5 ± 1,59	11,6 ± 0,36
Нейтрофіли, %	Молодий	91,2 ± 1,03	80,7 ± 2,62	28,7 ± 1,46	26,1 ± 1,47	14,9 ± 0,39
	Зрілий	92,3 ± 1,47	82,4 ± 1,7	29,6 ± 1,25	27,6 ± 1,85	15,2 ± 0,22
	Старечий	92,4 ± 2,08	86,2 ± 1,6	32,1 ± 1,60	30,1 ± 1,34	17,4 ± 0,31
Лімфоцити, %	Молодий	4,33 ± 0,44	4,81 ± 0,41	2,9 ± 0,63	2,6 ± 0,19	1,70 ± 0,17
	Зрілий	4,2 ± 0,27	4,1 ± 0,3	2,7 ± 0,14	2,6 ± 0,25	1,6 ± 0,12
	Старечий	4,0 ± 0,16	3,6 ± 0,28	2,3 ± 0,7	2,5 ± 0,13	1,2 ± 0,14
Моноцити, %	Молодий	0,5 ± 0,26	0,7 ± 0,12	0,18 ± 0,09	1,2 ± 0,15	–
	Зрілий	0,6 ± 0,12	0,8 ± 0,18	1,2 ± 0,12	1,1 ± 0,17	–
	Старечий	–	1,0 ± 0,22	1,3 ± 0,10	1,0 ± 0,26	–
Макрофаги, %	Молодий	–	4,1 ± 0,3	19,2 ± 0,29	21,1 ± 0,81	–
	Зрілий	–	3,8 ± 0,15	18,7 ± 0,32	19,5 ± 0,33	–
	Старечий	–	3,0 ± 0,24	15,9 ± 0,27	19,3 ± 0,16	–
Полібласти, %	Молодий	2,9 ± 0,17	6,2 ± 0,18	15,3 ± 0,18	16,1 ± 0,22	11,9 ± 0,41
	Зрілий	2,4 ± 0,21	5,8 ± 0,2	14,7 ± 0,13	14,6 ± 0,15	13,6 ± 0,34
	Старечий	2,1 ± 0,14	5,7 ± 0,3	16,9 ± 0,22	13,1 ± 0,23	11,6 ± 0,25
Фібробласти, %	Молодий	–	–	18,3 ± 0,2	21,5 ± 1,1	34,7 ± 0,55
	Зрілий	–	–	14,1 ± 0,17	15,7 ± 0,49	35,3 ± 0,87
	Старечий	–	–	9,4 ± 0,3	13,8 ± 0,65	30,2 ± 0,42
Ендотеліоцити, %	Молодий	–	0,8 ± 0,23	5,9 ± 0,22	8,4 ± 0,22	11,1 ± 0,49
	Зрілий	–	0,6 ± 0,11	3,5 ± 0,14	4,2 ± 0,15	8,7 ± 0,81
	Старечий	–	–	2,7 ± 0,16	3,3 ± 0,13	6,4 ± 0,43

Таблиця А.4 – Цитологічні показники стану поверхні рани шкіри тварин експериментальної серії різних вікових груп, $M \pm m$ ($n = 6$)

Клітинний склад	Вік	Термін спостереження, доба				
		1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
1	2	3	4	5	6	7
Кількість лейкоцитів у полі зору	Молодий	92,1 ± 3,12 p = 0,1229	83,2 ± 2,12 p = 0,0144	20,1 ± 0,98 p = 0,0064	18,1 ± 1,01 p = 0,1175	2,93 ± 0,33 p ≤ 0,0001
	Зрілий	95,7 ± 2,06 p = 0,0292	84,9 ± 2,86 p = 0,0154	26,1 ± 1,57 p = 0,2541	21,8 ± 1,12 p = 0,0881	5,65 ± 0,42 p = 0,0004
	Старечий	97,4 ± 1,86 p = 0,0002	87,6 ± 2,2 p = 0,0008	28,8 ± 1,72 p = 0,0225	23,1 ± 0,89 p = 0,2172	3,8 ± 0,36 p ≤ 0,0001
Нейтрофіли, %	Молодий	87,3 ± 1,27 p = 0,0383	76,2 ± 2,03 p = 0,2044	26,4 ± 1,33 p = 0,2712	24,6 ± 0,42 p = 0,3497	5,1 ± 0,17 p ≤ 0,0001
	Зрілий	88,6 ± 3,79 p = 0,3841	77,9 ± 3,52 p = 0,2754	27,1 ± 1,21 p = 0,1813	25,1 ± 1,76 p = 0,3506	5,5 ± 0,22 p ≤ 0,0001
	Старечий	90,1 ± 3,12 p = 0,5533	81,2 ± 2,88 p = 0,1601	30,7 ± 0,98 p = 0,4727	27,7 ± 1,14 p = 0,2024	10,6 ± 0,44 p ≤ 0,0001
Лімфоцити, %	Молодий	4,5 ± 0,8 p = 0,8560	6,6 ± 0,28 p = 0,0048	3,3 ± 0,62 p = 0,6605	2,0 ± 0,27 p = 0,0992	1,5 ± 0,12 p = 0,3591
	Зрілий	4,3 ± 0,34 p = 0,8225	5,4 ± 0,65 p = 0,0994	2,9 ± 0,24 p = 0,4881	2,8 ± 0,18 p = 0,5308	1,3 ± 0,14 p = 0,1348
	Старечий	4,1 ± 0,25 p = 0,7431	4,2 ± 1,12 p = 0,6146	2,7 ± 0,12 p = 0,5857	2,3 ± 0,14 p = 0,3198	1,1 ± 0,16 p = 0,9325
Моноцити, %	Молодий	0,6 ± 0,12 p = 0,7342	2,2 ± 1,17 p = 0,2310	0,24 ± 0,06 p = 0,5913	1,0 ± 0,25 p = 0,5083	–
	Зрілий	0,7 ± 0,26 p = 0,7342	2,7 ± 0,34 p = 0,0006	0,68 ± 0,11 p = 0,0096	0,8 ± 0,17 p = 0,2405	–
	Старечий	0,2 ± 0,09	3,4 ± 0,63 p = 0,0049	0,81 ± 0,12 p = 0,0106	0,7 ± 0,14 p = 0,0185	–
Макрофаги, %	Молодий	–	9,2 ± 0,33 p ≤ 0,0001	22,1 ± 0,52 p = 0,0007	29,4 ± 1,12 p ≤ 0,0001	–
	Зрілий	–	7,8 ± 0,46 p ≤ 0,0001	21,4 ± 0,76 p = 0,0084	32,6 ± 1,08 p ≤ 0,0001	–
	Старечий	–	7,1 ± 0,24 p ≤ 0,0001	18,2 ± 0,61 p = 0,0062	25,5 ± 1,16 p = 0,0004	–

Продовж. табл. А4

1	2	3	4	5	6	7
Полібласти, %	Молодий	5,62 ± 0,42 p ≤ 0,0001	8,4 ± 0,58 p = 0,0047	15,0 ± 0,77 p = 0,7123	18,0 ± 0,94 p = 0,0774	13,1 ± 0,41 p = 0,0653
	Зрілий	4,7 ± 0,23 p ≤ 0,0001	7,8 ± 0,36 p = 0,0007	16,1 ± 0,49 p = 0,0201	15,2 ± 0,62 p = 0,3691	14,9 ± 0,28 p = 0,0145
	Старечий	4,1 ± 0,62 p = 0,0104	7,1 ± 0,44 p = 0,0252	18,4 ± 0,65 p = 0,0537	14,1 ± 0,59 p = 0,1454	12,6 ± 0,36 p = 0,0457
Фібробласти, %	Молодий	–	1,5 ± 0,14	23,2 ± 1,18 p = 0,0022	26,4 ± 1,1 p = 0,0103	30,1 ± 0,31 p ≤ 0,0001
	Зрілий	–	–	19,3 ± 1,02 p = 0,0005	19,2 ± 0,71 p = 0,0023	31,4 ± 0,48 p = 0,0028
	Старечий	–	–	10,1 ± 0,86 p = 0,4599	16,8 ± 0,36 p = 0,0024	27,1 ± 1,06 p = 0,0216
Ендотеліоцити, %	Молодий	–	2,6 ± 0,44 p = 0,0046	7,2 ± 0,44 p = 0,0246	9,6 ± 0,25 p = 0,0048	14,6 ± 0,52 p = 0,0006
	Зрілий	–	1,9 ± 0,25 p = 0,0008	5,5 ± 0,23 p ≤ 0,0001	6,7 ± 0,16 p ≤ 0,0001	10,1 ± 0,36 p = 0,1453
	Старечий	–	–	3,1 ± 0,16 p = 0,1075	5,2 ± 0,44 p = 0,0020	8,2 ± 0,13 p = 0,0025

Таблиця А.5 Показники морфометрії гістологічних препаратів біоптатів рани шкіри щурів молодого віку контрольної серії, $M \pm m$ (n = 6)

Показник	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Відносна площа стромального набряку, %	16,64 ± 1,07	15,02 ± 1,33	10,17 ± 0,8	5,62 ± 0,69	–
Відносна площа судин дерми, %	7,48 ± 0,99	7,22 ± 0,21	6,28 ± 0,4	6,05 ± 0,52	5,93 ± 0,4
Середній діаметр судин дерми, мкм	24,11 ± 1,70	20,49 ± 1,57	16,32 ± 0,15	15,36 ± 0,632	15,42 ± 0,91
Відносна площа судин грануляційної тканини, %	–	3,46 ± 0,40	13,05 ± 0,73	15,09 ± 1,06	10,24 ± 1,01
Середній діаметр судин грануляційної тканини, мкм	–	10,03 ± 0,92	13,77 ± 0,39	14,11 ± 0,80	14,91 ± 0,95

Таблиця А.6 – Показники морфометрії гістологічних препаратів біоптатів рани шкіри щурів зрілого віку контрольної серії, $M \pm m$ (n = 6)

Показник	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Відносна площа стромального набряку, %	15,02 ± 1,38	17,36 ± 0,87	9,04 ± 0,44	5,93 ± 0,49	–
Відносна площа судин дерми, %	7,84 ± 0,92	7,69 ± 0,81	6,44 ± 0,52	6,10 ± 0,95	6,02 ± 0,46
Середній діаметр судин дерми, мкм	32,12 ± 1,61	27,41 ± 0,96	20,50 ± 1,02	18,94 ± 1,85	17,77 ± 1,04
Відносна площа судин грануляційної тканини, %	–	3,58 ± 0,30	11,97 ± 1,49	16,04 ± 0,72	12,60 ± 0,97
Середній діаметр судин грануляційної тканини, мкм	–	12,76 ± 0,36	15,14 ± 0,99	16,03 ± 0,68	17,05 ± 0,82

Таблиця А.7 – Показники морфометрії гістологічних препаратів біоптатів рани шкіри щурів старечого віку контрольної серії, $M \pm m$ (n = 6)

Показник	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Відносна площа стромального набряку, %	$18,79 \pm 0,87$	$20,48 \pm 1,44$	$16,51 \pm 0,96$	$11,11 \pm 0,80$	$4,39 \pm 0,71$
Відносна площа судин дерми, %	$8,41 \pm 0,40$	$8,08 \pm 1,01$	$7,65 \pm 0,64$	$6,54 \pm 0,78$	$6,23 \pm 0,77$
Середній діаметр судин дерми, мкм	$34,85 \pm 1,10$	$33,47 \pm 2,02$	$27,65 \pm 1,37$	$24,03 \pm 1,18$	$22,57 \pm 1,12$
Відносна площа судин грануляційної тканини, %	–	$2,07 \pm 0,37$	$8,62 \pm 0,71$	$11,84 \pm 0,86$	$10,84 \pm 0,98$
Середній діаметр судин грануляційної тканини, мкм	–	$10,03 \pm 0,32$	$12,41 \pm 0,97$	$14,48 \pm 0,93$	$18,74 \pm 1,14$

Таблиця А.8 – Показники морфометрії гістологічних препаратів біоптатів рани щурів молодого віку експериментальної серії, $M \pm m$ (n = 6)

Показник	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Відносна площа стромального набряку, %	15,02 ± 0,76 p = 0,2453	14,41 ± 1,65 p = 0,7794	7,10 ± 1,81 p = 0,1519	2,91 ± 1,45 p = 0,1224	–
Відносна площа судин дерми, %	7,57 ± 0,52 p = 0,9374	6,90 ± 0,47 p = 0,5481	5,59 ± 0,45 p = 0,2785	5,95 ± 0,39 p = 0,8808	5,88 ± 0,41 p = 0,9322
Середній діаметр судин дерми, мкм	23,94 ± 1,10 p = 0,9347	17,77 ± 1,25 p = 0,2051	15,73 ± 0,34 p = 0,1434	15,27 ± 0,30 p = 0,8415	15,32 ± 0,32 p = 0,9195
Відносна площа судин грануляційної тканини, %	–	4,18 ± 0,33 p = 0,1951	15,24 ± 1,06 p = 0,1197	12,54 ± 0,65 p = 0,0674	8,3, ± 1,33 p = 0,2724
Середній діаметр судин грануляційної тканини, мкм	–	11,68 ± 0,41 p = 0,1324	14,19 ± 0,60 p = 0,5703	14,26 ± 0,38 p = 0,8689	14,83 ± 0,36 p = 0,9388

Таблиця А.9 – Показники морфометрії гістологічних препаратів біоптатів рани шкіри щурів зрілого віку експериментальної серії, $M \pm m$ (n = 6)

Показник	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Відносна площа стромального набряку, %	14,76 ± 0,88 p = 0,8769	13,07 ± 3,36 p = 0,2247	6,7 ± 1,78 p = 0,2307	4,30 ± 1,03 p = 0,1835	–
Відносна площа судин дерми, %	7,54 ± 0,51 p = 0,7813	7,59 ± 0,33 p = 0,9112	6,17 ± 0,47 p = 0,7082	5,76 ± 0,40 p = 0,7483	5,79 ± 0,48 p = 0,7365
Середній діаметр судин дерми, мкм	30,89 ± 1,36 p = 0,5724	25,02 ± 3,26 p = 0,4979	17,69 ± 3,25 p = 0,4286	17,88 ± 0,74 p = 0,6063	17,42 ± 0,74 p = 0,7895
Відносна площа судин грануляційної тканини, %	–	4,11 ± 0,43 p = 0,3359	13,99 ± 2,12 p = 0,4537	18,63 ± 0,97 p = 0,0576	16,22 ± 2,18 p = 0,1602
Середній діаметр судин грануляційної тканини, мкм	–	14,77 ± 2,01 p = 0,3482	16,81 ± 0,51 p = 0,1646	18,92 ± 0,68 p = 0,132	18,24 ± 0,99 p = 0,3764

Таблиця А.10 – Показники морфометрії гістологічних препаратів біоптатів рани шкіри щурів старечого віку експериментальної серії, $M \pm m$ (n = 6)

Показник	Термін дослідження, доба				
	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Відносна площа стромального набряку, %	17,23 ± 0,73 p = 0,1996	18,33 ± 0,90 p = 0,2342	13,07 ± 0,44 p = 0,0086	9,60 ± 0,71 p = 0,1884	3,53 ± 0,36 p = 0,3054
Відносна площа судин дерми, %	8,23 ± 0,49 p = 0,7818	8,37 ± 0,62 p = 0,8116	7,07 ± 0,30 p = 0,4310	6,37 ± 0,28 p = 0,8416	6,27 ± 0,77 p = 0,9714
Середній діаметр судин дерми, мкм	34,23 ± 1,02 p = 0,6881	33,64 ± 1,27 p = 0,9446	25,65 ± 3,47 p = 0,6036	22,39 ± 1,86 p = 0,4737	21,23 ± 2,62 p = 0,6482
Відносна площа судин грануляційної тканини, %	–	2,59 ± 0,32 p = 0,3128	10,12 ± 0,40 p = 0,955	13,98 ± 0,55 p = 0,0625	12,72 ± 0,55 p = 0,1253
Середній діаметр судин грануляційної тканини, мкм	–	11,26 ± 0,78 p = 0,1753	12,99 ± 0,40 p = 0,5926	15,14 ± 0,56 p = 0,5568	19,42 ± 1,05 p = 0,6702

ДОДАТОК Б
(обов'язковий)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної
роботи ВДНЗ України «Буковинський
державний медичний університет»

доцент _____ І.В. Геруш

« _____ 2016 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** «Моделювання дефектів шкіри у експериментальних тварин».
2. **Установа розробник:** Сумський державний університет, медичний інститут.
3. **Автор:** аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
4. **Джерело інформації:**
 - а. Моделирование дефектов кожи у експериментальних животных / А.Н. Олешко., В.В. Корниенко., Ю.А. Ткаченко [и др.] // Georgian medical news. – 2013. – № 2 (239). – С. 103-108.
 - б. Патент на корисну модель № 91169 України, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованої травми шкіри з руйнуванням всіх її шарів в умовах експерименту на лабораторних тваринах / Олешко О.М., Корнієнко В.В., Ткаченко Ю.А. [та ін.], власник: Сумський державний університет. № u 2014 00251; заявл. 13.01.14; опубл. 20.06.14. Бюл. № 12.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра анатомії людини імені М.Г. Туркевича ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет».
6. **Термін впровадження:** березень – липень 2016 року.
7. **Форма впровадження:** в наукову роботу кафедри, матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.

Відповідальний за впровадження:

**Завідувач кафедри анатомії
людини імені М.Г. Туркевича
ВДНЗ України «Буковинський державний
медичний університет»**

доктор медичних наук, професор


В.В. Кривецький

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи

Львівського національного

медичного університету ім. Данила Галицького

д. м. н., професор  Гжегоцький М.Р. 05 _____ 2016 р.**– АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

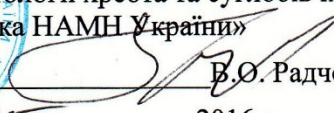
1. **Найменування пропозиції про впровадження:** «Використання хітозану для лікування пошкоджень шкіри різної етіології».
2. **Установа розробник:** Сумський державний університет, медичний інститут.
3. **Автор:** аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
4. **Джерело інформації:**
 - a. Погорелов М.В. Використання хітозану для лікування пошкоджень шкіри різної етіології / М.В. Погорелов, О.В. Калінкевич, О.В.Солодовник [та ін.] // Таврический медико-биологический вестник. - 2013. - Том 16, №1, ч.2 (61) - С. 150-154.
 - b. Oleshko O. New experimental model for studying skin injuries on rats / O. Oleshko, M. Pogorielov // Folia Medica Cassoviensia: 6th International Student Medical Congress in Kosice 25th - 27th of June 2014: тези доп.- Kosice, 2014. - С. 32-33.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.
6. **Термін впровадження:** 2016 рік.
7. **Форма впровадження:** в наукову роботу та в матеріали лекцій та практичних занять кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією д.мед.н., проф.




3.3.Масна

ЗАТВЕРДЖУЮ
 Заст. директора з наукової роботи
 ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім.
 проф. М.І. Ситенка НАМН України»
 д.м.н., професор  В.О. Радченко
 « 17 » 05 2016 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Клітинний склад поверхні рани при використанні інноваційних хітозанових покриттів
 (назва пропозиції для впровадження)
2. Сумський державний університет, 40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31. Олешко О.М.
 (установа-розробник, її поштова адреса; прізвище, ініціали авторів)
3. Аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
 (прізвище, ініціали авторів)
4. Джерело інформації:
 - 1) Oleshko A. Cell compound of wound after the chitosan membranes application / Alexandr Oleshko // Eur. J. Med. Series B. – 2014. – Vol. 1(1). – P. 27-43.;
 - 2) Pogorelov M. Cell toxicity of new Chitosan films for skin replacement / M/Pogorelov, A. Oleshko: зб. тез. доповідей наук.-практ. конф. [«Морфологічні дослідження – виклики сучасності»] (Суми, 23-24 квітня 2015). – Суми, 2015. – С. 107-108.
5. Найменування установи, яка здійснила впровадження: ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», лабораторія морфології сполучної тканини
6. Термін впровадження: 2016 р.
7. Форма впровадження: у науково-дослідну роботу.

Відповідальна за впровадження особа
 Зав. лабораторії морфології сполучної тканини
 д. біол. н., професор  Дедух Н.В.

17.05.2016

(дата)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

Вінницького національного

медичного університету

ім. М.І. Пирогова



02 2016 року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції про впровадження:** «Матеріали для лікування дефектів шкіри: перспективи застосування похідних хітозану».
2. **Установа розробник:** Сумський державний університет, медичний інститут.
3. **Автор:** аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
4. **Джерело інформації:**
 - а. Погорелов М.В. Матеріали для лікування дефектів шкіри: перспективи застосування похідних хітозану / М.В. Погорелов, В.В. Корнієнко, Ю.А. Ткаченко [та ін.] // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2013. – Том 1, № 1. – С. 275-284.
 - б. Дейнека В.М. Спосіб моделювання гнійної рани в експерименті на лабораторних тваринах / В.М. Дейнека, Т.В. Івахнюк, О.М. Олешко [та ін.] // Актуальні питання сучасної медицини: міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених, присвячена 20-річчю медичного факультету Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна 18-19 квітня 2013 р.: тези доп. - Харків, 2013. – С. 98.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра анатомії людини Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.
6. **Термін впровадження:** 2016 рік.
7. **Форма впровадження:** в наукову роботу та в матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри

анатомії людини

д.мед.н., проф.

Л.В. Фоміна

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

Запорізького медичного
державного університету

 Туманський В.О.
« 23 » 02 2016 року



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції про впровадження:** «Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових плівок у тварин старечого віку».
2. **Установа розробник:** Сумський державний університет, медичний інститут.
3. **Автор:** аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
4. **Джерело інформації:**
 - а. Корнієнко В.В. Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових плівок у тварин старечого віку / В.В. Корнієнко, О.М. Олешко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. - Вип. 4, Том 1 (113). - С. 275-278.
 - б. Патент на корисну модель № 89985 України, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованого термічного опіку шкіри лабораторним щурам / Олешко О.М., Корнієнко В.В., Ткаченко Ю.А. [та ін.], власник: Сумський державний університет. № u 2013 13489; заявл. 20.11.13; опубл. 12.05.14, Бюл. № 9.
1. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра анатомії людини Запорізького медичного державного університету.
2. **Термін впровадження:** 2016 рік.
3. **Форма впровадження:** в наукову роботу та в матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри

анатомії людини

д.мед.н., проф.

М.А. Волошин

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

Тернопільського державного

медичного університету

імені І.Я.Горбачевського



3 2015 року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції про впровадження:** «Клітинна характеристика ранової поверхні при застосуванні хітозану для лікування ран різної етіології в віковому аспекті».
2. **Установа розробник:** Сумський державний університет, медичний інститут.
3. **Автор:** аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
4. **Джерело інформації:**
 - a. Age Futures of Wound Treatment With Chitosan Films Application / Alexandr N. Oleshko // European Journal of Medicine. – 2014, Vol.(4), № 2. – С. 87-100.
 - b. Ткаченко Ю.А. Клітинна характеристика ранової поверхні при застосуванні хітозану для лікування ран різної етіології / Ю.А. Ткаченко, О.М. Олешко, В.М. Дейнека, М.В. Погорелов// Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 10-12 квітня 2013 р.: тези доп. - Суми, 2013. – С. 23 – 24.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра гістології, цитології та ембріології Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.
6. **Термін впровадження:** 2016 рік.
7. **Форма впровадження:** в наукову роботу та в матеріали лекцій та практичних занять.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри гістології,

цитології та ембріології

д.б.н., проф.

К.С. Волков

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
ВДНЗУ «Українська медична
стоматологічна академія»
професор *І.П. Капшаев*
«24» 2016 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** «Моделювання дефектів шкіри у експериментальних тварин».
2. **Установа розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
3. **Джерело інформації:** Моделирование дефектов кожи у експериментальних животнох / А.Н. Олешко, В.В. Корниенко, Ю.А. Ткаченко [и др.] // Georgian medical news. – 2015. № 2 (239). – С. 103-108.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії з секційним курсом ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** в науково-дослідну роботу.
6. **Термін впровадження:** грудень 2015 – січень 2016р.
7. **Суть впровадження:** запропонований спосіб моделювання механічної травми шкіри дозволяє чітко дотримуватися заданих критеріїв площі та глибини рани, отримати інформативні гістологічні препарати та продовжити життя тварин для вивчення різних фаз репаративного процесу.

Пропозиція для впровадження обговорена та затверджена на засіданні кафедри. Протокол засідання кафедри № 13 від 24.02.2016р.

Завідувач кафедри патологічної анатомії з секційним курсом
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна
академія», д.мед.н., професор

І. Старченко
І. Старченко

Доцент кафедри патологічної анатомії з секційним курсом
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна
академія», к.мед.н., доцент

О.К. Прилуцький
О.К. Прилуцький

Доцент кафедри патологічної анатомії з секційним курсом
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна
академія», к.мед.н., доцент

Н.В. Ройко
Н.В. Ройко

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Тернопільського державного
медичного університету
імені І.Я. Горбачевського

« 21 » 03 2016 року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції про впровадження:** «Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових плівок у тварин старечого віку».
2. **Установа розробник:** Сумський державний університет, медичний інститут.
3. **Автор:** аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології Олешко О.М.
4. **Джерело інформації:**
 - а. Корнієнко В.В. Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових плівок у тварин старечого віку / В.В. Корнієнко, О.М. Олешко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. - Вип. 4, Том 1 (113). - С. 275-278.
 - б. Патент на корисну модель № 89985 України, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованого термічного опіку шкіри лабораторним щурам / Олешко О.М., Корнієнко В.В., Ткаченко Ю.А. [та ін.], власник: Сумський державний університет. № у 2013 13489; заявл. 20.11.13; опубл. 12.05.14, Бюл. № 9.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра нормальної анатомії людини Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.
6. **Термін впровадження:** 2016 рік.
7. **Форма впровадження:** в наукову роботу та в матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри нормальної

анатомії людини

д.мед.н., проф.



І.Є. Герасимюк