

Министерство образования и науки Российской Федерации
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт биомедицинских систем и биотехнологий

Работа допущена к защите

Директор высшей школы

_____ О.Л. Власова

«___» _____ 2020 г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ
МАТЕРИАЛОВ С ГЕМОСТАТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ НА ОСНОВЕ
ХИТОЗАНА И НАНОФИБРИЛЛ ХИТИНА**

по направлению подготовки 16.04.01 Техническая физика

Профиль 16.04.01_10 Медицинская биотехнология

Выполнил

студент гр. 4741601/81001

Е.Н. Маевская

Руководитель

профессор, д.ф-м.н.

В.Е. Юдин

Консультант

По нормоконтролю

В.П. Октябрьский

Санкт-Петербург

2020

РЕФЕРАТ

На 85 с., 25 рисунка, 2 таблицы

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ХИТОЗАН, НАНОФИБРИЛЛЫ ХИТИНА, МОКРЫЙ МЕТОД ФОРМОВАНИЯ, ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ, ОСТАНОВКА КРОВОТЕЧЕНИЯ, ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, КОНТАКТ С КРОВЬЮ

Тема выпускной квалификационной работы: «Получение и исследование свойств композиционных материалов с гемостатическим эффектом на основе хитозана и наночастиц хитина».

Данная работа посвящена исследованию свойств композиционных материалов на основе хитозана и наночастиц хитина с целью создания кровоостанавливающего препарата на их основе. Методом мокрого формования были получены композиционные волокна с различным содержанием наночастиц хитина, проведены испытания их механических и сорбционных характеристик. В результате был определен оптимальный диапазон концентраций наночастиц хитина с точки зрения физико-механических свойств.

Для изучения взаимодействия полученных материалов с кровью были проведены эксперименты *in vitro*. Результаты контакта композиционных волокон с клеточными элементами крови и степень гемолиза плазмы, как и впитываемость крови губками, дали основания полагать, что наибольшим кровоостанавливающим эффектом обладают материалы с добавлением 0,5% наночастиц хитина.

Испытания *in vivo* подтвердили наиболее проявленное гемостатическое действие у материалов с содержанием наночастиц хитина 0,5%. Для анализа эффектов долгосрочного взаимодействия композиционных материалов с организмом была проведена их имплантация.

Таким образом, в результате данной работы был получен кровоостанавливающий материал, сравнимый по эффективности с существующими коммерческими гемостатическими препаратами, изучены его физико-

механические характеристики, а также последствия взаимодействия с организмом.

ABSTRACT

85 pages, 25 pictures, 2 tables.

KEYWORDS: CHITOSAN, CHITIN NANOFIBRILS, WET SPINNING METHOD, HEMOSTATIC MATERIAL, BLEEDING STOP, PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES, CONTACT WITH BLOOD

The subject of the graduate qualification work is “Obtaining and investigation of composite materials with hemostatic effect based on chitosan and chitin nanofibrils”.

The given work is devoted to the study of the properties of composite materials based on chitosan and chitin nanofibrils to create a hemostatic agent. Composite fibers with different content of chitin nanofibrils were obtained by wet spinning method and their mechanical and sorption characteristics were investigated. As a result, the optimal range of concentrations of chitin nanofibrils was determined in terms of physical and mechanical properties.

In vitro experiments were conducted to study the interaction of the obtained materials with blood. The results of the contact of composite fibers with blood cell elements and the degree of plasma hemolysis, as well as the absorption of blood by sponges, suggest the best hemostatic action of materials with 0,5% chitin nanofibrils content.

In vivo tests confirmed the highest hemostatic effect of materials with the addition of 0,5% chitin nanofibrils. To study the effects of long-term interaction of composite materials with the body, their implantation was conducted.

Thus, as a result of this work, a hemostatic material was obtained with comparable efficiency with existing commercial hemostatic drugs, its physical and mechanical characteristics were studied, as well as the consequences of interaction with the organism.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Процесс гемостаза в норме.....	10
1.2. Методы оценки гемостатических свойств	14
1.3. Методы остановки кровотечений	17
1.4. Классификация используемых гемостатических материалов	18
1.5. Выбор кровеостанавливающего материала	22
1.6. Использование хитозана в биомедицинских целях	23
1.7. Механизм гемостатических свойств хитозана	24
1.8. Введение наполнителей в материалы на основе хитозана	25
1.9. Влияние характеристик хитозана на свойства изготавливаемых изделий.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Материалы.....	29
2.2. Диспергирование суспензии НФХ.....	29
2.2.1. Исследование устойчивости суспензии НФХ.....	29
2.2.2. Спектрофотометрическое исследование растворов	30
2.2.3. Микроскопическое исследование композиционных плёнок.....	30
2.2.4. Определение механических характеристик композиционных волокон.....	31
2.3. Получение растворов	31
2.4. Изучение реологических свойств растворов	31
2.5. Получение волокон.....	32

2.6. Получение нетканого материала.....	33
2.7. Получение губок.....	33
2.8. Измерение механических характеристик нитей.....	34
2.9. Влияние влажности среды на механические свойства волокон.....	34
2.10. Сорбционные характеристики композиционных волокон.....	35
2.11. Измерение дзета-потенциала нетканых материалов	36
2.12. Контакт композиционных волокон с кровью <i>in vitro</i>	37
2.13. Исследование впитывающих способностей губок	38
2.14. Испытания <i>in vivo</i>	38
2.14.1. Исследование кровеостанавливающих свойств материалов	39
2.13.2. Исследование биорезорбции композиционных волокон	40
2.13.3. Имплантация нетканых материалов.....	40
2.15. Статистическая обработка результатов	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	42
3.1. Диспергирование хитина	42
3.1.1. Спектрофотометрическое исследование суспензии.....	42
3.1.2. Спектрофотометрическое исследование растворов	43
3.1.3. Микроскопическое исследование плёнок.....	45
3.1.4. Влияние способа диспергирования на механические характеристики волокон.....	46
3.2. Реологические свойства растворов хитозана и НФХ	47
3.3. Влияние на механические характеристики хитозановых волокон введения в них НФХ	48
3.4. Влияние влажности среды на механические характеристики волокон	

3.5. Сорбционные характеристики композиционных волокон.....	51
3.6. Измерение дзета-потенциала нетканых материалов.....	53
3.7. Контакт композиционных волокон с кровью <i>in vitro</i>	55
3.8. Измерение впитывающей способности губок.....	59
3.9. Гистологическое исследование имплантированных композиционных волокон.....	60
3.10. Исследование биорезорбции волокон методом оптической микроскопии	63
3.11. Испытания гемостатических свойств материалов.....	64
3.12. Имплантация гемостатических материалов	66
ГЛАВА 4. ВЫВОДЫ	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	74

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НФХ – наночибриллы хитина

σ – разрывное напряжение

ε – деформация до разрыва

E – модуль Юнга

ζ – дзета-потенциал

η – вязкость

ε – диэлектрическая проницаемость

k_B – проводимость раствора

a – величина сорбции

$\Delta\mu_1$ – изменение химического потенциала водяного пара при сорбции

α – термический коэффициент сорбции

ВВЕДЕНИЕ

Неконтролируемые кровотечения остаются одной из главных причин смертности при военных действиях, а также в мирное время в процессе хирургических операций, сопровождаясь большим количеством осложнений и побочных эффектов [32]. Для их остановки и предотвращения используют многочисленные гемостатические препараты, которые, однако, имеют значительное число ограничений и особенностей применения, в связи с чем разработка новых эффективных кровеостанавливающих материалов не теряет своей актуальности. Одним из наиболее перспективных полимеров для создания материалов биомедицинского назначения и, в частности, гемостатических средств является хитозан ввиду его биосовместимых и биорезорбируемых свойств. Одним из способов улучшения физико-механических и биологических характеристик получаемых на основе хитозана изделий является введение добавок, в качестве которых можно использовать наночастицы хитина, как исходного сырья для получения хитозана.

Целью данной работы является получение кровеостанавливающих композиционных материалов на основе хитозана и наночастиц хитина с последующим исследованием их характеристик. Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние использования различных режимов диспергирования суспензии наночастиц хитина на свойства композиционных растворов и получаемых на их основе волокон;
2. Получить хитозановые волокна с добавлением наночастиц хитина и нетканые материалы на их основе с дальнейшим исследованием физико-механических характеристик;
3. Изучить биологические свойства хитозановых волокон и губок, наполненных наночастицами хитина, при контакте с кровью *in vitro*;

4. Исследовать эффективность остановки кровотечений при использовании губок и нетканых материалов на основе хитозана и нанофибрилл хитина, а также последствия их долгосрочного взаимодействия с организмом.

Работа была выполнена на базе научно-исследовательской лаборатории "Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии" СПбПУ Петра Великого.

Результаты работы были представлены на конференциях всероссийского уровня с международным участием, таких как «Неделя науки СПбПУ» [11][9], «Физика – наукам о жизни» [12], научно-практический форум «SMARTEX» [10], а также на международных конференциях в Словении [69] и Португалии [67]. Кроме того, данные, представленные в этой работе, были опубликованы в виде статей в журналах, входящих в базу цитирования Scopus [29, 55, 68].

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Остановка кровотечения во время проведения хирургических операций всё ещё является одной из наиболее актуальных проблем медицины. Существует много средств, предназначенных для решения этой задачи, однако все они имеют свои ограничения. Для создания эффективного и безопасного гемостатического препарата важно понимать основу процессов в организме, обеспечивающих свёртываемость крови, механизмы действия применяемых в настоящее время кровеостанавливающих материалов, их преимущества и недостатки, а также эффекты их взаимодействия с организмом.

1.1. Процесс гемостаза в норме

Система гемостаза – это совокупность функционально-морфологических и биохимических механизмов, обеспечивающих остановку кровотечения и, вместе с тем, поддерживающих кровь в жидком состоянии преимущественно внутри сосудов [4]. Выделяют три основных механизма, которые могут функционировать как одновременно, так и с преобладанием одного из них:

- Сосудисто-тромбоцитарный
- Коагуляционный (свёртывание крови)
- Фибринолиз

Сосудисто-тромбоцитарный механизм активируется в течение первой минуты после повреждения сосуда за счёт активации тромбоцитов и их скопления в этой области с образованием пробки – белого тромба. Активация тромбоцитов происходит за счёт их адгезии, в основе которой лежат два механизма: 1) поверхность тромбоцитов заряжена отрицательно, в то время как поверхность мембраны эндотелия сосудов – положительно; 2) высвобождение фактора Виллебранда при повреждении стенки сосуда.

Фактор Виллебранда необходим для нормального прилипания тромбоцитов к коллагену и формирования тромбоцитарной пробки. Коллаген является стимулятором гемостаза, стимулирующим не только прилипание тром-

боцитов, но и запуск внутреннего пути свёртывания крови. Сами тромбоциты играют важную роль в процессе гемостаза, участвуя, помимо образования пробки и механизмах свёртывания крови, в поддержании структуры и функции стенок сосудов, доставляя питательные вещества клеткам эндотелия [7].

До взаимодействия тромбоцитов с повреждённым участком сосуда происходит их перестройка, включающая изменение формы с плоской дискоидной на сферическую и выбрасывание псевдоподий для прикрепления к соединительной ткани и друг к другу [13]. Склеивание тромбоцитов сопровождается образованием конгломератов, в результате чего тромб увеличивается в размерах и закупоривает сосуд в течение 1-3 минут. Агрегация и адгезия тромбоцитов приводит к секреции биологически-активных веществ (АДФ, адреналин, норадреналин и другие), участвующих в запуске дальнейших реакций. Из-за неплотности белого тромба он способен закупорить только мелкие сосуды, в связи с чем реализуется запуск коагуляционного механизма [14].

Свёртывание крови регулируется многочисленными факторами свёртывания крови. В результате образуется красный тромб для закупорки сосуда фибриновым сгустком, включающим в себя эритроциты.

Каскад реакций свёртывания крови, называемый общим путём коагуляции, подразделяется на внутренний (инициируется белками плазмы крови) и внешний (инициируется белками повреждённой ткани). Факторы свёртывания плазмы крови обозначаются римскими цифрами (факторы I – XIII), факторы свёртывания, выделяемые тромбоцитами – арабскими (факторы 1-12). При этом выделяют следующие стадии:

- 1) Фаза активации – переход протромбина в тромбин;
- 2) Фаза коагуляции – переход фибриногена в фибрин;
- 3) Фаза ретракции – образование плотного фибринового сгустка.

Внутренний путь коагуляции связан с повреждением ткани, в результате чего тромбопластин (фактор III) попадает в кровь через повреждённую стенку сосуда и соединяется с факторами плазмы и тромбоцитов, активируя фак-

тор VII.

Внутренний путь активируется при контакте крови с повреждённым сосудом, вследствие чего происходит агрегация тромбоцитов и выделение фактора 3. При повреждении открываются коллагеновые волокна, соприкосновение с которыми запускает активацию фактора Хагемана (XII). Его активированная форма, в свою очередь, участвует в активации фактора Розенталя (XI). Таким образом, за счёт каскадной реакции происходит последовательная активация факторов коагуляции вплоть до фактора Прауэра-Стюарта (X).

В активации фактора X помимо фактора VIII участвует комплекс фактора IX с фактором 3, ионы кальция, а также активированный фактор VII из внешнего пути коагуляции, в связи с чем дальнейший каскад реакции носит название общего пути свёртывания крови. Активированная форма фактора X способствует активации фактора V, а также фактора XIII, который в дальнейшем связан с полимеризацией фибрина. Под действием протромбиназы происходит превращение протромбина в тромбин, который, в свою очередь, связан с дальнейшей активацией факторов V, VII, VIII и превращением растворимого фибриногена в нерастворимую форму фибрина с дальнейшей полимеризацией. Общая схема реакций представлена на рис. 1.1.

В образующейся сети фибрина остаются эритроциты, увеличивающие плотность сгустка. При взаимодействии с тромбоцитами плотность сгустка ещё больше увеличивается за счёт выталкивания из него плазмы – ретракция сгустка. Характерное время от начала каскадной реакции до её завершения составляет 10 минут.

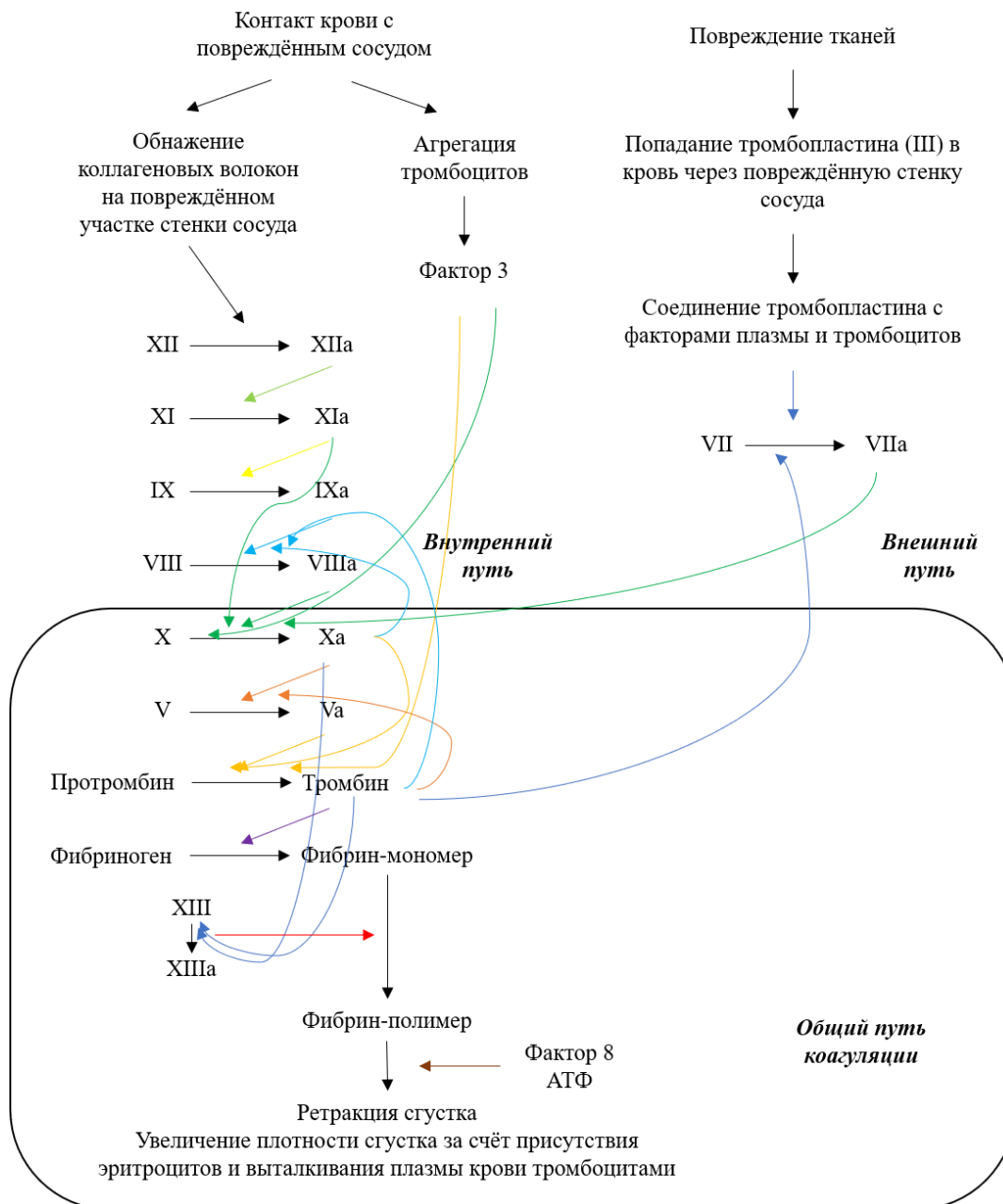


Рис. 1.1. Схема свёртывания крови

В результате действия свёртывающей системы крови происходит образование фибринового сгустка крови. Активация фермента плазмы крови пламиногена приводит к его превращению в плазмин (фибриноген), катализирующего рассасывание ретрагированного сгустка. Превращение пламиногена в плазмин происходит при воздействии активаторов крови и тканей, которые, в свою очередь, также изначально находятся в виде проактиваторов. Таким образом, при восстановлении повреждённого сосуда происходит запуск каскада реакций, приводящего к растворению тромба – фибринолиз.

1.2. Методы оценки гемостатических свойств

Методы оценки гемостатических свойств материалов можно разделить на две большие группы: *in vitro* и *in vivo*. При этом каждый метод имеет свои достоинства и недостатки, в связи с чем предпочтительно комбинировать их друг с другом. Методы *in vitro* являются лишь приближёнными к условиям реального применения без учёта всех реакций, происходящих в организме, что снижает достоверность эксперимента. В то же время, испытания на животных сопряжены с этическими сложностями, а также с погрешностью результатов ввиду индивидуальных особенностей, что, с другой стороны, значительно приближает эксперимент к реальным условиям применения в клинике [61].

Для испытаний *in vitro* используют либо цельную кровь, либо её отдельные интересующие фракции. К наиболее часто применяемым методам относятся следующие:

1) Тесты свёртываемости крови

Их используют для оценки эффективности действия внешнего и внутреннего путей свёртывания крови. Для забора крови используют пробирки с цитратом натрия, который связывает необходимый для свёртывания крови кальций, после чего кровь центрифугируют и отделяют плазму. Показателем эффективности внутреннего и общего пути является активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), которое определяют замером времени до образования сгустка после добавления к плазме крови активатора и фосфолипидов, а также хлорида кальция. Протромбиновое время используют для оценки эффективности внешнего пути свёртывания крови, при этом замеряется время до образования сгустка после добавления кальция и тканевого фактора III. Аналогично, тромбиновое время является показателем эффективности конечного этапа свёртывания крови, для чего к плазме крови добавляется тромбин и измеряется время превращения фибриногена в фибрин [86].

2) Тромбодинамика

Данный метод, в отличие от тестов свёртываемости крови, позволяет оценить пространственно-временные изменения. Моделирование процесса образования сгустка крови производят помещением плазмы в прозрачную кювету, после чего к ней добавляют инициатор свёртывания крови – тканевой фактор, являющийся аналогом повреждённой стенки сосуда. Процесс образования сгустка крови покадрово регистрируют, после чего появляется возможность оценить не только скорость роста сгустка, но и патологические процессы, например, наличие спонтанного сгусткообразования [87].

3) Тромбоэластография

Суть метода заключается в измерении прочности сгустка. Для этого после активации процессов свёртывания крови в кювете её начинают вращать вместе с образующимся сгустком. В отличие от описанных выше методов исследования свёртываемости, испытания проводятся на цельной крови, а не на плазме, что приближает испытания к ситуации *in vivo* [91].

4) Методы исследования взаимодействия материала с тромбоцитами

Тромбоциты являются важнейшим звеном процесса гемостаза, участвуя в образовании белого тромба и увеличивая плотность кровяного сгустка. В связи с этим, исследование их адгезии, агрегации и открепления также является способом оценить эффективность потенциального гемостатического агента. Для этого используют счётчики клеток крови, позволяющие определить процентное отношение свободных и прикреплённых к материалу тромбоцитов [102]; оптическую и электронную микроскопию, позволяющую наблюдать изменение формы клеток и характер их взаимодействия с исследуемым образцом [101], а также проточную цитометрию, которая даёт возможность оценивать количество клеток крови, их активацию, морфологию и изменения в цитозоле [86].

5) Гемолиз

Взаимодействие материала с кровью может сопровождаться разрушением эритроцитов и выделением гемоглобина. Определение с помощью спек-

трофотометра оптической плотности контактирующих с образцом эритроцитов позволяет вычислить степень гемолиза. При этом в роли отрицательного контроля выступает оптическая плотность целых эритроцитов, а в роли положительного – полностью разрушенных. Оптическую плотность растворов определяют при длине волны 540 нм или 545 нм [62].

Относительно самих материалов, немаловажными являются испытания их физико-механических характеристик, дающих представления о поведении материала при деформационных нагрузках, а также о его абсорбционных и впитывающих способностях [61].

Методы исследования *in vitro* позволяют получить информацию о поведении крови при контакте с гемостатическим материалом, оценить клеточную реакцию и динамику изменений, однако именно эксперименты *in vivo* могут дать представление об эффективности изучаемого препарата при взаимодействии с организмом. Однако они значительно менее стандартизированы, ввиду чего исследователи проводят испытания на сильно отличающихся моделях. К наиболее часто используемым подопытным животным относятся лабораторные крысы, иногда также используют мышей и кроликов. Все испытания обязательно проводятся в условиях анестезии и с соблюдением норм по проведению экспериментов на животных.

Для моделирования кровотечения из паренхиматозных органов чаще всего производят либо разрез печени, размеры которого варьируются от 5 мм до 1 см, либо вырезание её части [59, 63]. Сосудистое кровотечение индуцируют отрезанием кончика хвоста мыши или крысы (длина участка варьируется от 4 мм [26] до 5 см [99]), либо разрезанием бедренной артерии или вены [83]. В случае, если испытание проводится на кроликах, нередко используют ушную вену [59, 100].

Практически все испытания гемостатических материалов на животных сводятся к измерению времени остановки кровотечения. За редким исключением материал немедленно прикладывают к месту повреждения, однако в некоторых случаях выдерживается пауза в 5 [63], 10 [52], а порой и 60 секунд

[65]. Также часто оценивается объём кровотечения, который находят как разницу между массой материала после достижения гемостаза и его массой до испытания [75]. К субъективным, но, тем не менее, важным оцениваемым характеристикам относится степень адгезии материала к ране, удобство его использования, манипуляционные свойства [65].

Помимо приближения эксперимента к реальным условиям, исследования *in vivo* дают возможность изучить долговременное взаимодействие материала с организмом, проявляющееся в реакции тканей на чужеродный объект, изменение клеточного состава, толщину образующейся соединительнотканной капсулы, а также наличие или отсутствие способности материала к биорезорбции. При этом оптимальной длительностью эксперимента считается 14 суток [61].

Разумеется, для оценки эффективности гемостатического материала следует провести несколько видов испытаний, позволяющих наиболее полно изучить его поведение при контакте с кровью. При этом предварительные испытания *in vitro* могут дать представление об изменениях параметров плазмы и клеток крови, а эксперименты *in vivo* способны приблизить условия к реальным и проследить долгосрочные последствия применения материала.

1.3. Методы остановки кровотечений

Для остановки кровотечений, возникающих при операционном вмешательстве, существует многообразие методов. Одними из самых простых и используемых в первую очередь являются механические способы, включающие в себя прямое давление на рану, использование хирургических нитей, зажимов и скоб. Они используются в самых простых случаях, когда кровотечение легко идентифицируется, а место повреждения может быть быстро запечатано [81].

Термические методы включают в себя использование лазеров, гемостатических скальпелей и других инструментов для коагуляции тканевых белков и эритроцитов, механической закупорки повреждённого сосуда и стимулиро-

вания его вазоконстрикции [50]. Имеются сведения о высокой эффективности подобных методов, а также о большом разнообразии используемого оборудования и режимов его использования [53], однако их применение сопряжено со значительными рисками. Наиболее серьёзным последствием является возможность повреждения ткани вплоть до развития её некроза [45]; кроме того, увеличивается вероятность возникновения повторного кровотечения [38].

Использование инъекций эпинефрина, витамина К, транексамовой кислоты и прочих веществ, способствующих свёртыванию крови, связано с их непосредственным участием в каскаде реакций, приводящего к остановке кровотечения. Показано, что их предварительное введение уменьшает риск возникновения кровотечений во время операций [17], а также снижает вероятность повторных кровотечений [64]. Однако данный метод используется лишь для предотвращения возникновения кровотечения, либо для его остановки в комбинации с другими способами.

Самым распространённым и широко используемым методом остановки кровотечений остаётся использование поверхностных гемостатических материалов ввиду удобства их применения и широкого разнообразия.

Кровоостанавливающие материалы выпускают в различных формах, таких как плёнки, губки, гидрогели, гранулы, порошки, волокна, спреи, а также создаваемые на их основе тканые и нетканые материалы. Каждая форма имеет свои преимущества и ограничения, обеспечивая высокую эффективность при использовании в конкретных случаях.

1.4. Классификация используемых гемостатических материалов

Современные гемостатические материалы, предназначенные для остановки внутренних кровотечений, в зависимости от механизма действия подразделяют на две группы [8]:

- Связанные с ускорением химических процессов локального гемостаза;

- Осуществляющие агрегацию клеток крови (в первую очередь тромбоцитов) за счёт физического взаимодействия.

Ниже перечислены основные вещества, наиболее часто используемые для изготовления кровеостанавливающих средств.

1) Гемостатический воск

Одним из самых простых средств для остановки кровотечений является костный воск, который изготавливают из пчелиного воска, парафина, вазелина и используют при костных операциях [22]. Он удобен для использования и обладает низкой стоимостью благодаря доступным и недорогим ингредиентам в составе. Механизм гемостатического действия заключается в создании физического барьера, закрывающего повреждённый сосуд [107]. Однако наличие побочных эффектов, таких как сильно выраженная тканевая реакция, большая вероятность развития бактериальной инфекции и даже замедление заживления кости сильно ограничивают его применение [27, 33].

2) Окисленная целлюлоза

Механизм действия материалов на основе окисленной целлюлозы связан с разложением полимера при контакте с влажной средой с образованием так называемой целлюлозной кислоты [35]. При этом происходит понижение локального pH, что провоцирует лизис эритроцитов и высвобождение гемоглобина, превращающегося в кислый гематин при контакте с целлюлозной кислотой [15]. Снижение значения pH способствует развитию дополнительного антимикробного действия [74], однако, в то же время, сопряжено с вероятностью развития воспаления и задержкой заживления раны [93]. К тому же, это ограничивает совместное применение гемостатиков на основе окисленной целлюлозы с другими кровеостанавливающими агентами [45].

3) Желатин

Гемостатические свойства желатина могут быть объяснены, в первую очередь, его высокой способностью к впитыванию жидкости, в том числе крови, что сопровождается увеличением в размерах и способствует ограничению кровотока, что, в то же время, является его главным недостатком, не

позволяя применять в ограниченных пространствах [56]. Также предполагается, что взаимодействие желатина с тромбоцитами приводит к высвобождению тромбопластина, принимающего участие в цепочке реакций, приводящих к остановке кровотечения [49]. В отличие от окисленной целлюлозы, желатин применяется при нейтральном рН, что снимает ограничение на применение других кровеостанавливающих агентов. Однако имеются сведения об увеличении риска возникновения инфекции при использовании материалов на основе желатина [37].

4) Крахмал

При использовании гранул крахмала происходит абсорбция жидкой фракции крови, в результате чего происходит увеличение концентрации высокомолекулярных элементов крови с белками свёртывания, и, как следствие, возникает гемостаз [72]. Аналогично с желатином, способность крахмала сильно набухать также проявляется в ограничениях его применения [58], однако быстрая резорбция оказывает минимальные эффекты на прилежащие ткани и организм в целом [19].

5) Цеолиты и каолиниты

Использование неорганических алюмосиликатов связано с их способностью к абсорбции воды из крови, что приводит к концентрированию факторов свёртываемости. Взаимодействие с элементами крови сопровождается высвобождением ионов кальция, который, в свою очередь, участвует в активации фактора свёртывания крови XII [43]. Гемостатики на основе цеолитов отличаются низкой стоимостью, удобством хранения и применения, в связи с чем входят в набор первой помощи у военных [16], однако экзотермическая реакция в момент использования нередко сопровождается ожогами [71].

6) Коллаген

Коллаген участвует в запуске внутреннего пути каскада реакций, способствующих свёртыванию крови. В результате происходит образование тромбина из протромбина и полимеризация фибрина, составляющих основу кровяного сгустка [18]. Ввиду того, что главным механизмом действия кол-

лагена в качестве кровеостанавливающего агента является ускорение химических процессов, а не физическое взаимодействие, его использование не сопровождается сильным набуханием материала, что является одним из главных недостатков многих гемостатиков [45]. В то же время, это ограничивает применение материала у пациентов с тромбоцитопенией, а его прилипание к перчаткам и инструментам затрудняет использование [8].

7) Белки свёртывания крови

Фибрин и тромбин активно используются для создания кровеостанавливающих препаратов, так как они принимают непосредственное участие в процессе свёртывания крови, причём в финальной стадии каскада реакций, приводящих к образованию кровяного сгустка, в связи с чем обладают высокой эффективностью. Но одновременно с этим, использование человеческих факторов свёртывания крови значительно увеличивает риск развития иммунного ответа [39, 95], а также стоимость изделия [57].

Основные характеристики перечисленных кровеостанавливающих агентов представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Характеристики гемостатических материалов

Материал	Механизм действия	Преимущества	Недостатки	Резорбция
Костный воск	Физический барьер	Низкая стоимость	Только для костей; развитие инфекции; тканевой ответ	-
Окисленная целлюлоза	Понижение pH приводит к лизису эритроцитов и высвобождению гемоглобина	Низкий pH способствует антимикробному эффекту	Низкий pH сопровождается увеличением воспаления; нельзя использовать с другими гемостатическими агентами	2-6 недель
Желатин	Впитывание жидкости; ограничение кровотока; взаимодействие с тромбоцитами с высвобождением тромбопластины	Отлично останавливает кровотечения из мелких сосудов	Не подходит для ограниченного пространства в связи с сильным набуханием; может быть очагом инфекции	4-6 недель

Крахмал	Абсорбция воды из крови; концентрирование факторов свёртываемости	Быстрая резорбция	Не подходит для ограниченного пространства в связи с сильным набуханием (до 500%)	1 неделя
Цеолиты и каолиниты	Абсорбция воды из крови; концентрирование факторов свёртываемости, высвобождение кальция	Удобно применять и хранить, низкая стоимость	Экзотермическая реакция, которая может сопровождаться ожогами	-
Коллаген	Запуск каскада реакций свёртывания крови	Нет сильного набухания	Не подходит для пациентов с тромбоцитопенией; прилипает к перчаткам и инструментам	До 8 недель
Белки свёртывания крови	Участие в каскаде реакций свёртывания крови	Эффективны, так как непосредственно участвуют в реакциях	Иммунный ответ; высокая стоимость	Зависит от материала основы

1.5. Выбор кровеостанавливающего материала

Идеальный гемостатический материал для использования при внутриполостных операциях должен, в первую очередь, быстро останавливать массивные кровотечения из крупных сосудов и паренхиматозных органов и не допускать возникновения повторных кровотечений, но также обладать стабильностью, биосовместимостью и биорезорбируемостью, не оказывать отрицательного влияния на прилежащие ткани и организм в целом, быть удобным для использования и недорогим [51, 90].

Очевидно, изготовить материал, обладающий всеми перечисленными характеристиками, невозможно, в связи с чем возникает необходимость выбирать наиболее подходящий агент в зависимости от ситуации. На это влияет тип кровотечения, особенности организма пациента, а также такие факторы как доступность, стоимость и удобство использования материала для хирурга [15, 80].

Тип ткани, на которой проводится операция, также является одним из наиболее существенных факторов при выборе кровеостанавливающего препарата. Например, гемостатический воск подходит только для остановки костных кровотечений, а материалы на основе желатина или крахмала не рекомендуется использовать вблизи нервов ввиду их возможного сдавливания в результате сильного набухания полимеров. В то же время, в отличие от окисленной целлюлозы, их можно применять одновременно с факторами свёртывания крови, например, тромбином, для ускорения остановки серьёзных кровотечений. Белки, участвующие в каскаде реакций свёртывания крови, безусловно, являются одними из наиболее эффективных способов обеспечить быстрый гемостаз, однако необходимо учитывать их высокую стоимость и возможные побочные аллергические реакции. Таким образом, ввиду наличия большого числа ограничений у существующих гемостатических материалов, разработка новых средств и использование других полимеров для их изготовления является актуальной задачей современной медицины.

1.6. Использование хитозана в биомедицинских целях

Одним из наиболее перспективных полимеров для создания материалов медицинского профиля является хитозан – линейный полисахарид, получаемый из хитина при его деацетилировании [79]. Отщепление ацильной группы сопровождается образованием свободных аминогрупп, в результате чего полимер становится водорастворимым при значениях pH меньше 6, что делает его использование более простым и безопасным [76].

Основными свойствами, определяющими широкое использование хитозана для создания материалов медицинского назначения, являются его биосовместимость, способность к биорезорбции, бактерицидные свойства, а также отсутствие цитотоксичности [78]. Ведутся активные разработки раневых покрытий на его основе [94], противоожоговых препаратов [24], систем доставки лекарств [28], костных имплантатов [54], хирургических шовных нитей [31], а также гемостатических материалов [46]. Также большим пре-

имуществом хитозана является возможность изготовления из него различных форм препаратов – гидрогели, плёнки, волокна, тканевые и нетканые покрытия.

В организме человека хитозан деградирует под воздействием, главным образом, лизоцима с образованием низкомолекулярных веществ, которые затем уничтожаются фагоцитарными клетками [96]. Важно отметить, что продукты резорбции полимера являются совершенно безопасными для организма и, более того, способствуют регенерации окружающих тканей [99]. Благодаря способности проникать через кожу, а также отсутствию токсичности и аллергенности, хитозан используют и для производства косметической продукции [20].

1.7. Механизм гемостатических свойств хитозана

На данный момент нет точного и полного объяснения механизма гемостатического действия хитозана, однако большая часть теорий сводится к трём основным процессам.

1) Сорбция плазмы

Способность останавливать кровотечение зависит от сорбционных свойств материала, обусловленных жидким состоянием плазмы крови. Набухающая способность хитозана (200-500% от исходного содержания) [77] указывает на большие сорбционные свойства: от 50 до 300% жидкости от его первичной массы [48]. К тому же, адсорбция воды и низкомолекулярных веществ материалом приводит к концентрированию факторов свёртывания, обеспечивая большую скорость остановки кровотечения.

2) Коагуляция эритроцитов

Наличие положительного заряда у хитозана благодаря аминогруппам приводит к электростатическому взаимодействию полимера с отрицательно заряженными клетками крови, вследствие чего происходит агрегация эритроцитов вокруг места раны с образованием тромбов, которые быстро останавливают кровотечение [103].

3) Адгезия тромбоцитов

Главной причиной наличия гемостатических свойств у хитозана является способность к адгезии тромбоцитов, их агрегации и активации. К тому же, имеются сведения об активации факторов II и III, участвующих в каскаде реакций свёртываемости крови [46].

1.8. Введение наполнителей в материалы на основе хитозана

Для усиления кровеостанавливающих свойств материалов на основе хитозана используют введение различных наполнителей. Благодаря их синергическому эффекту, можно добиться не только ускорения достижения гемостаза, но также способствовать более быстрому заживлению раны. Например, введение желатина в раствор хитозана способствует увеличению набухания и механических свойств получаемых плёнок [60], а композиционные губки на их основе продемонстрировали значительно больший кровеостанавливающий эффект при совместном использовании полимеров, нежели каждого из них в отдельности [34]. Альгинат, ещё один биосовместимый полисахарид, также активно используется в медицине. Было показано, что его добавление при изготовлении хитозановых плёнок сопровождается усилением гемостатических свойств при моделировании печёночного кровотечения на крысах [46]. Аналогично, использование сочетания поливинилового спирта с хитозаном сопровождается повышением набухания и сорбционных свойств гидрогелей, что является важной характеристикой для потенциального гемостатического материала [34].

Одним из наиболее популярных кровеостанавливающих материалов является Surgicel, изготавливаемый из окисленной целлюлозы. Сочетание хитозана с целлюлозой проявилось в лучшем гемостатическом действии полученного материала, а также в ускорении его резорбции в организме [85]. Кроме того, цитотоксические испытания показали высокую пролиферативную активность клеток на губках при соотношении полимеров 50:50.

Ещё одним примером для создания гемостатических композиционных губок является смесь хитозана, полиакрилата и полиэтиленгликоля. Полученные материалы также продемонстрировали повышенные гемостатические свойства при моделировании артериального кровотечения за счёт усовершенствованной пористой структуры и усиленного влагопоглощения [106].

Введение микросфер из каолина позволяет увеличить поры получаемого материала, а также усилить кровеостанавливающие свойства за счёт синергического эффекта двух гемостатических агентов [90]. К тому же, микросферы имеют ряд преимуществ для создания материалов медицинского назначения, таких как большая площадь поверхности и стимулирование адгезии клеток [44]. Другим примером сочетания физического и физиологического механизмов гемостатического действия материалов является комбинирование хитозана с коллагеном, который участвует в запуске каскада реакций, приводящих к образованию кровяного сгустка [84], или непосредственно с факторами свёртывания крови [47, 97].

Ряд исследований по созданию композиционных кровеостанавливающих материалов на основе хитозана направлено не только на ускорение достижения гемостаза или увеличение объёма впитываемой крови, но на улучшение их последующего взаимодействия с организмом. Так, введение поликапролактона способствует усилению антибактериального и противовоспалительного эффектов, а использование полиакриловой кислоты помогает снизить цитотоксичность [21, 25]. Для усовершенствования ранозаживляющих способностей материалов используют множество добавок, таких как серебряные или золотые наночастицы [60], поликапролактон [108], глицерол [66], гиалуроновая кислота [82] и многие другие. Последующую биорезорбцию материалов также можно контролировать за счёт сочетания хитозана с другими полимерами, при необходимости увеличивая или снижая срок нахождения образца в организме.

Таким образом, с помощью добавок других полимеров можно увеличить антибактериальные свойства хитозана, уменьшить цитотоксичность получа-

емых препаратов, способствовать более быстрому заживлению раны и, что наиболее важно для гемостатического материала, увеличить его впитывающие способности и скорость остановки кровотечения.

1.9. Влияние характеристик хитозана на свойства изготавливаемых изделий

Молекулярная масса и степень деацетилирования хитозана являются определяющими характеристиками с точки зрения влияния на физико-механические и биомедицинские свойства получаемых на его основе материалов. При обработке хитина 40-45% водным раствором NaOH при температуре 110-160°C в течение нескольких часов снижается концентрация ацильных групп и увеличивается содержание свободных аминогрупп [23]. Таким образом, степень деацетилирования, измеряющаяся в процентном содержании ацетилглюкозаминных звеньев к общему количеству мономерных звеньев полисахарида, является мерой перехода хитина в хитозан.

Увеличение степени деацетилирования хитозана сказывается, в первую очередь, на способности полимера растворяться в слабокислых водных растворах за счёт протонирования аминогрупп. Существенное влияние степень деацетилирования оказывает и на взаимодействие материалов с организмом. Было показано, что увеличение количества свободных аминогрупп снижает скорость резорбции в сравнении с хитином, у которого наблюдается наименьший срок деградации материала в организме [36]. Также имеются данные о влиянии степени деацетилирования на антибактериальные свойства хитозана, которые были максимальны у частично деацетилированного хитина [42, 78].

Молекулярная масса полимера оказывает наиболее сильное влияние на механические свойства получаемых материалов. Вязкость растворов полимеров и прочность получаемых из них изделий увеличивается с увеличением молекулярной массы [92]. Также были проведены исследования на антимикробную активность полимеров с различными значениями молекулярной мас-

сы. Так, использование высокомолекулярного хитозана было сопряжено с увеличением антибактериального действия в сравнении с олигомерами [73], однако для антигрибковой активности наблюдался противоположный эффект [40].

Данные характеристики сказываются и на кровеостанавливающих свойствах материалов на основе хитозана. Было показано, что увеличение молекулярной массы сопровождается значительным ростом гемостатической активности [70], а использование хитозана с высокой степенью деацетилирования приводит к усиленной агрегации эритроцитов и тромбоцитов [104]. Оптимальным с точки зрения агрегации крови по мнению авторов [41] является диапазон молекулярной массы хитозана от 8,6 до 247 кДа. Олигомеры хитозана с меньшей молекулярной массой не оказывали никакого влияния на агрегацию крови, в то время как полимеры со значением молекулярной массы, превышающим верхний предел (247 кДа), были связаны с ингибированием данного процесса. Разные авторы также выделяли диапазоны оптимальной степени деацетилирования хитозана, однако их результаты не всегда сходятся друг с другом. Несмотря на то, что увеличение количества свободных аминогрупп связано с увеличением положительного заряда, а, следовательно, и с взаимодействием с отрицательно заряженными клетками крови, верхним пределом степени деацетилирования, обеспечивающей наиболее эффективное кровеостанавливающее действие материалов является 92,5%. При этом выдвигается предположение о значимости баланса отрицательного и положительного зарядов хитозана для гемостатических свойств [41].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Исследования проводились с использованием хитозана фирмы Biolog Nerre (Германия) с молекулярной массой 164 кДа и степенью деацетилирования 92%. Нанофибриллы хитина (НФХ) поставлялись компанией SRL Mavi Sud (Италия) в виде водной суспензии с концентрацией 20 мг/мл, с длиной нанофибрилл 600 нм и диаметром 25 нм.

2.2. Диспергирование суспензии НФХ

Для использования НФХ в качестве добавки к растворам хитозана требовалось предварительно разрушить образующиеся в суспензии агрегаты с помощью ультразвукового воздействия. В связи с этим, было проведено сравнение нескольких режимов диспергирования с различной частотой, мощностью и временем воздействия для выбора оптимального способа (табл. 2.1). Для генерации режимов различной мощности и частоты были использованы стержневой диспергатор ИЛ 10-0,63 (Россия) (способы 1-3) и ультразвуковая ванна УЗВ-1.3 «Сапфир» (Россия) (способ 4).

Таблица 2.1

Способы диспергирования суспензии НФХ

Способ	Время, мин	Частота, кГц	Мощность, Вт
1	4	25	630
2	7	25	630
3	10	25	630
4	30	35	130

2.2.1. Исследование устойчивости суспензии НФХ

Спустя некоторое время после диспергирования НФХ начинают снова образовывать агрегаты. Чтобы понять, в течение какого времени после воз-

действия ультразвуком нанофибриллы находятся в диспергированном состоянии, было проведено спектрофотометрическое исследование суспензии при различных способах диспергирования (спектрофотометр «СФ-2000», Россия). Спектры оптической плотности суспензии снимались в кювете толщиной 1 см в диапазоне длин волн от 200 нм до 600 нм сразу после воздействия ультразвуком (0 минут), а также спустя 1 час, 2 часа, 4 часа и 1 сутки.

2.2.2. Спектрофотометрическое исследование растворов

Для выбора оптимального режима диспергирования с точки зрения распределения разбиваемых агрегатов в растворе и исследования их устойчивости были проведены исследования поглощения растворов полимеров в ультрафиолетовой и видимой областях. Для спектрофотометрического исследования были приготовлены растворы с общей концентрацией полимеров 0,1 мас.%; концентрация НФХ составляла 30% от массы хитозана. Измерения проводились сразу после их приготовления (0 минут), а также спустя 1 сутки и 1 неделю для исследования стабильности полученных растворов.

2.2.3. Микроскопическое исследование композиционных плёнок

Использование разных режимов и времени воздействия при диспергировании суспензии НФХ приводит к различиям в размерах получаемых агрегатов. Для того, чтобы оценить влияние силы и длительности воздействия на конечный размер фибрилл хитина, были отлиты плёнки, которые затем были исследованы методом оптической микроскопии. Для сопоставления результатов со спектрофотометрическими исследованиями, плёнки были изготовлены из тех же растворов: общая концентрация полимеров составляла 0,1 мас.%; концентрация НФХ – 30% от массы хитозана. Микроскопическое исследование проводилось с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Scope A1 (Германия) при увеличении 50х.

2.2.4. Определение механических характеристик композиционных волокон

Ввиду того, что диспергирование НФХ необходимо для последующего формирования композиционных волокон из получаемых растворов, важно рассмотреть влияние выбора способа диспергирования не только на устойчивость суспензии и композиционных растворов, но в том числе и на свойства готовых изделий. В связи с этим было проведено измерение механических характеристик получаемых волокон при использовании различных режимов диспергирования.

Для исследования влияния способа диспергирования суспензии НФХ на механические свойства волокон были изготовлены растворы с 30% содержания НФХ от массы хитозана, общая концентрация полимеров в растворе составляла 4 мас.%. Волокна были изготовлены из полученных растворов при фильтровой вытяжке 50% в соответствии с пунктом 2.4 и затем испытаны в соответствии с пунктом 2.7.

2.3. Получение растворов

Для получения растворов к навеске хитозана добавлялась дистиллированная вода для набухания полимера, а также диспергированная суспензия НФХ в концентрации от 0,1% до 50% от массы хитозана. Общая концентрация полимеров составляла 3 мас.% для последующего изготовления губок и 4 мас.% для формирования волокон. Смесь перемешивалась в течение 30 минут, после чего добавлялась ледяная уксусная кислота в количестве 2 мас.% от общей массы, и полученный раствор перемешивался ещё не менее часа. Готовые растворы помещались в холодильник при температуре 4°C, после чего фильтровались и обезвоздушивались при давлении 0,1 атм.

2.4. Изучение реологических свойств растворов

Исследование влияния введения НФХ в растворы хитозана на их реологические свойства проводилось с использованием реометра Physica MCR-301

Anton Paar (Австрия) при температуре 20°C по методу «цилиндр в цилиндре». В пространство между двумя цилиндрами помещалось 5 мл раствора, после чего внутренний цилиндр начинал вращаться с определённой скоростью, при этом внешний цилиндр оставался неподвижным. Измерения вязкости растворов при изменении скорости сдвига проводились в режимах увеличения («Top») и уменьшения («Down») скорости деформации.

Ввиду того, что при формировании волокон по мокрому методу скорости сдвига раствора при его прохождении через фильеру составляют от 20 с⁻¹ до 190 с⁻¹ [30], при исследовании реологических свойств был выбран диапазон скоростей сдвига от 1 с⁻¹ до 4000 с⁻¹.

2.5. Получение волокон

Формование композиционных волокон осуществлялось по мокрому способу [105] на установке, схема которой приведена на рис. 2.1. Раствор подавался через фильеру в осадительную ванну, состоящую из смеси 10% водного раствора NaOH и этанола в соотношении 1:1, в результате чего происходила коагуляция полимера. Полученные нити промывались дистиллированной водой и просушивались при температуре 40°C. Суммарная концентрация полимеров в растворе при этом составляла 4 мас.% ввиду оптимальной вязкости раствора с точки зрения его прохождения через фильеру [29], концентрация НФХ варьировалась от 0,1% до 50% от массы хитозана. Также были изготовлены нити без введения НФХ (0%).

Для получения монофиламентных волокон использовалась фильера с одним отверстием диаметром 0,6 мм, скорость подачи раствора составляла 0,2 мл/мин. Для изготовления полифиламентных нитей применялась фильера со 100 отверстиями диаметром 0,1 мм, скорость подачи была 0,3 мл/мин. Регулированием скорости первого ролика варьировалась фильерная вытяжка волокна от 0% до 100%; отношение скоростей роликов друг к другу определяло пластификационную вытяжку, составляющую 20%.

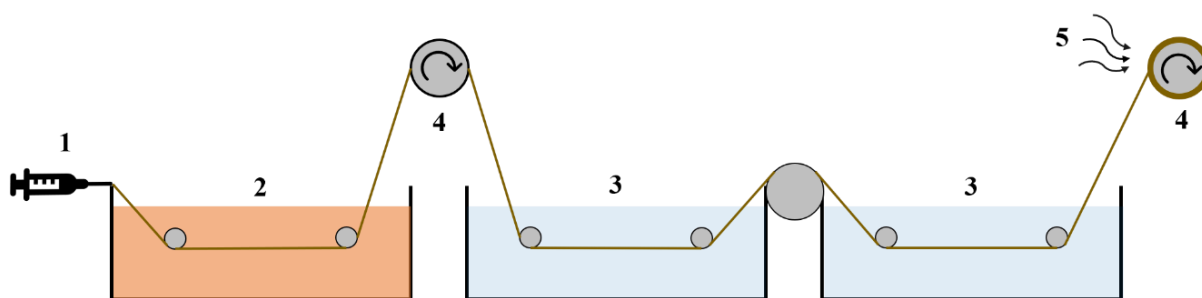


Рис. 2.1. Схема установки для формирования волокон: 1 – подача раствора, 2 – осадительная ванна, 3 – промывочная ванна, 4 – ролик, 5 – просушка полученных волокон.

2.6. Получение нетканого материала

Для изготовления нетканого материала предварительно были получены полифиламентные нити по описанной выше методике, их диаметр в обоих случаях составлял приблизительно 10 мкм. С помощью специальной установки они гофрировались и нарезались так, что штапельная длина составляла 80 мм; общая масса волокон была 20 г. Методом иглопробивания на установке кафедры технологии и проектирования текстильных изделий СПбГУПТИД были получены нетканые материалы.

2.7. Получение губок

Выбор оптимальной концентрации НФХ с точки зрения кровеостанавливающих свойств материалов производился при использовании композиционных губок с различным содержанием НФХ ввиду простоты их изготовления. Получение губок осуществлялось из растворов с концентрацией НФХ 0%; 0,5%; 5% и 50% от массы хитозана. Общая концентрация композиций хитозан/НФХ в растворе составляла 3%. Растворы замораживали при температуре -20°C , затем подвергали лиофильной сушке при температуре -2°C и давлении 1,6 Па на установке Freeze Dry System (США). Для перевода губок в основную, не растворимую в воде форму, их обрабатывали 10% водным раствором NaOH в течение 10 минут, после чего промывали дистиллированной водой.

2.8. Измерение механических характеристик нитей

Для измерения механических свойств волокон они были предварительно выдержаны не менее суток при нормальных климатических условиях: относительной влажности 66% и температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Волокна были взвешены, после чего был найден их диаметр по формуле:

$$d = \sqrt{\frac{4m}{\pi\rho l}},$$

где d – диаметр волокна, мм;

m – масса волокна, мг;

ρ – плотность хитозана и хитина, г/см³;

l – базовая длина волокна, мм.

Испытания механических свойств волокон проводили на разрывной машине Instron 5943, базовая длина волокна составляла 100 мм, скорость нагружения волокна – 10 мм/мин.

2.9. Влияние влажности среды на механические свойства волокон

Ввиду планируемого использования материала в контакте с организмом человека, где такие условия как температура и влажность отличаются от нормальных, и, более того, зависят от ткани, в которую помещён материал, было проведено исследование влияния влажности среды на механические характеристики композиционных волокон. Для этого волокна были помещены в эксикаторы с относительным давлением водяного пара (P/P_0) в диапазоне от 0,10 до 0,98; относительная влажность воздуха в эксикаторах создавалась с использованием насыщенных растворов солей. Эксикаторы были термостатированы при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Предварительно волокна термостатировались в сушильной камере при температуре 80°C до достижения постоянного веса; содержание влаги контролировалось гравиметрическим методом. Образцы находились в эксикаторах до установления сорбционного равновесия (3-7 недель), после чего определялись их механические свойства.

2.10. Сорбционные характеристики композиционных волокон

Аналогично пункту 2.8, предварительно высушенные волокна выдерживались в эксикаторах с различным относительным давлением водяных паров до достижения постоянной массы. После достижения волокнами сорбционного равновесия производился расчёт их сорбционной способности по следующей формуле:

$$a = \frac{m_{\text{вл}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{сух}}},$$

где a – величина сорбции, г/г;

$m_{\text{вл}}$ – масса волокон после достижения сорбционного равновесия, г;

$m_{\text{сух}}$ – масса волокон в сухом состоянии, г.

Полученные в ходе эксперимента значения отображались на графике в осях $a = f(P/P_0)$. Для построения изотерм сорбции также были получены расчётные значения по параметрам, найденным по экспериментальным точкам. Для этого использовалось термическое уравнение сорбции [89]:

$$a = a_0 \exp\left(-\left(\frac{-\Delta\mu_1}{E}\right)^n + \alpha(T - T_0)\right),$$

где a – величина сорбции при парциальном давлении пара P и температуре T , г/г;

a_0 – предельная величина сорбции при давлении насыщенного пара P_0 и температуре T_0 , г/г;

$\Delta\mu_1$ – изменение химического потенциала водяного пара при сорбции;

E – характеристическая энергия сорбции, Дж/моль;

n – ранг распределения Вейбулла ($n=0,3-0,33$ для плотно упакованных и растворимых в сорбате полимеров) [2];

α – термический коэффициент сорбции, K^{-1} ;

$T_0 = 298$ К.

Изменение химического потенциала водяного пара при сорбции рассчитывалось по формуле $\Delta\mu_1 = RT \ln(P/P_0)$. Параметры a_0 и E были найдены

при линейной аппроксимации графического отображения зависимости $\ln a = \ln a_0 - \frac{1}{E^n} (-\Delta\mu_1)^n$.

Построение зависимости величины сорбции от относительного давления водяных паров для экспериментальных и расчётных значений позволяло судить о корреляции полученных данных и, соответственно, об адекватности полученной в ходе расчётов модели.

2.11. Измерение дзета-потенциала нетканых материалов

Для исследования возможных причин различного гемостатического действия нетканых материалов с добавлением НФХ и без них было проведено измерение их дзета-потенциала с помощью прибора SurPASS™ 3 (Anton Paar, Австрия) по методу, описанному в [88].

При контакте двух фаз, из которых хотя бы одна является жидкой, происходит образование двойного электрического слоя, состоящего из потенциалопределяющих и противоионов. При движении поток жидкости увлекает с собой часть противоионов диффузного слоя за счёт разрыва двойного электрического слоя. Это движение ионов представляет собой перенос заряда вдоль плоскости скольжения (потенциал на которой является дзета-потенциалом), то есть поверхностный электрический ток. В результате на выходе из капилляра образуется избыток противоионов, и на концах капилляра возникает потенциал течения, который связан с движением встречного потока ионов по всему объёму капилляра – объёмный ток. При установлении равновесия силы поверхностного и объёмного токов будут равны, что даёт возможность получить выражение, связывающее потенциал течения с дзета-потенциалом [1]:

$$\zeta = \frac{dU_{str}}{d\Delta p} \frac{\eta}{\varepsilon\varepsilon_0} k_B,$$

где ζ – значение дзета-потенциала, мВ;

$\frac{dU_{str}}{d\Delta p}$ – изменение потенциала течения при изменении давления жидкости, мВ/мбар;

η – вязкость воды, Па*с;

ε – диэлектрическая проницаемость воды;

k_B – проводимость раствора, Ом⁻¹*м⁻¹.

В данной работе измерение потенциала течения осуществлялось при изменении давления жидкости в капилляре в диапазоне от 200 мбар до 600 мбар, в результате чего рассчитывалось значение дзета-потенциала. Для каждого исследуемого материала два образца размерами 20x10 мм² помещались друг напротив друга на расстоянии 100 мкм; наблюдалось изменение дзета-потенциала при изменении рН среды в диапазоне от 5 до 9 за счёт добавления 0,05 моль/л раствора КОН в 0,001 моль/л раствор КСl при температуре 23°С.

2.12. Контакт композиционных волокон с кровью *in vitro*

Исследования взаимодействия композиционных волокон с концентрацией НФХ 0%; 0,5%; 5%; 30% и 50% проводили на базе Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова. Кровь получали на станции переливания крови Алмазовского Центра, которую забирали у здоровых волонтеров из локтевой вены утром натощак в пробирку с гепарином лития в объеме 9,0 мл. Для экспериментов использовали колонки, изготовленные из 20,0 мл шприцов, в которые помещали нарезанные на 0,5-1,0 см исследуемые волокна, полученные методом мокрого формования при значении фильерной вытяжки 50%, общей массой около 100 мг. После промывания колонки физиологическим раствором с гепарином в них добавляли донорскую кровь в объёме 7,0-7,5 мл, затем помещали на роторную мешалку со скоростью вращения 10 об/мин. Спустя 5, 20, 40 и 60 минут проводили анализ взаимодействия крови с волокнами: изменения клеточных популяций крови регистрировали на гематологическом анализаторе SySmex 1800i (Япо-

ния), а изменение оптической плотности плазмы крови, получаемой после центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут, регистрировали на спектрофотометре UNICO 280(S) (США). Скорость адгезии клеток рассчитывалась по формуле:

$$v = \frac{A - B}{t},$$

где v – скорость адгезии клеток, кл/мкл/мин;

A – количество клеток в единице объема крови в конце временного интервала, кл/мкл;

B – количество клеток в единице объема крови в начале временного интервала, кл/мкл;

t – исследуемый временной интервал, мин.

2.13. Исследование впитывающих способностей губок

Одной из важных характеристик гемостатических материалов является их впитывающая способность, в связи с чем были проведены исследования влияния концентрации НФХ на возможность адсорбировать кровь. Губки с различным содержанием НФХ нарезали на кусочки одинаковой площади (10×10 мм²) и разной высоты: 3 мм и 5 мм. После предварительного взвешивания губок (W_1) их приводили в контакт с кровью крыс в течение 1 мин и повторно взвешивали (W_2). Впитывающая способность губок (W) рассчитывалась как разность между полученными значениями массы: $W = W_2 - W_1$. Далее проводилось сравнение результатов с учётом высоты губки и концентрации НФХ.

2.14. Испытания *in vivo*

Для исследования эффективности полученных кровеостанавливающих материалов были проведены их испытания *in vivo*. Исследование проводилось на базе лаборатории экспериментальной хирургии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского универси-

тета при согласовании действий с локальным этическим комитетом. В качестве лабораторных животных были использованы самцы крыс линии Wistar-Kyoto массой 230-250 г. Все эксперименты проводились при общей анестезии и в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (принципы Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

Для использования в хронических экспериментах исследуемые материалы были предварительно стерилизованы методом автоклавирования при температуре 110°C в течение 50 минут.

2.14.1. Исследование кровеостанавливающих свойств материалов

Испытания кровеостанавливающих свойств материалов проводились в два этапа. В первой фазе экспериментов были использованы губки без содержания НФХ и с концентрациями НФХ 0,5%; 5%; 50% при моделировании артериального кровотечения. Для этого у крыс выбривалась внутренняя сторона бедра, после чего они фиксировались на операционном столе; с помощью хирургических инструментов обеспечивался доступ к бедренной артерии. После рассечения сосуда испытываемый образец размером 7×7×4 мм³ немедленно прикладывался к месту повреждения и засекалось время до полной остановки кровотечения. В качестве контрольной группы выступало время кровотечения без использования гемостатических препаратов.

Второй этап состоял из испытаний нетканых материалов, изготовленных без добавления НФХ и с их содержанием 0,5%. Данная концентрация была выбрана благодаря продемонстрированным результатам в предыдущих экспериментах. Эксперимент был разделён на две группы: моделирование артериального и венозного кровотечений. Аналогичным способом обеспечивался доступ к сосудисто-нервному пучку, после чего в зависимости от группы эксперимента перерезалась либо бедренная артерия, либо бедренная вена. В качестве группы сравнения были выбраны два коммерчески доступных гемо-

статических материала с различными механизмами действия: Surgicel Nu-Knit (Ethicon, США), изготовленный из окисленной целлюлозы, и Tachocomb (Takeda Austria GmbH, Австрия), состоящий из фибриногена и тромбина.

2.13.2. Исследование биорезорбции композиционных волокон

Для исследования взаимодействия материалов с организмом была проведена имплантация волокон хитозана (0% НФХ) и композиционных волокон с содержанием НФХ 0,5% и 30% в *m. latissimus dorsi* на сроки в 14, 28 и 91 сутки. В зависимости от места имплантации исследование было разделено на две группы: внутримышечное и субфасциальное введение.

После истечения срока эксперимента волокна извлекались из организма животных вместе с участком прилежащей ткани для последующего гистологического исследования с целью изучить тканевой ответ на чужеродный объект. Для этого извлечённые образцы тканей с материалом фиксировались в 10% растворе формалина в фосфатном буфере в течение 24 часов. Далее производилась обработка этиловым спиртом с последовательным увеличением концентрации от 10% до 99%, в результате чего образец приобретал прозрачность, достаточную для исследования с помощью световой микроскопии. После фиксации в парафине образцы окрашивались гематоксилином и эозином и нарезались на тонкие пластины. Тканевой ответ на имплантированный материал наблюдался с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия).

Для анализа степени биорезорбции имплантированных волокон образцы очищались от прилежащих тканей, после чего изучались с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Scope A1 (Германия).

2.13.3. Имплантация нетканых материалов

Ввиду планируемого использования получаемых гемостатических материалов для остановки внутренних кровотечений с возможностью оставить материал в организме без проведения повторных операций по его удалению,

была проведена имплантация образцов в лабораторных животных. Материалы были помещены субфасциально в проекции *m. latissimus dorsi* на срок в 14 суток. В качестве контрольной группы так же были использованы материалы Surgicel Nu-Knit и Tachocomb. По истечению срока эксперимента были взяты биоптаты, включающие участок ткани вместе с исследуемым образцом, для последующего гистологического исследования.

2.15. Статистическая обработка результатов

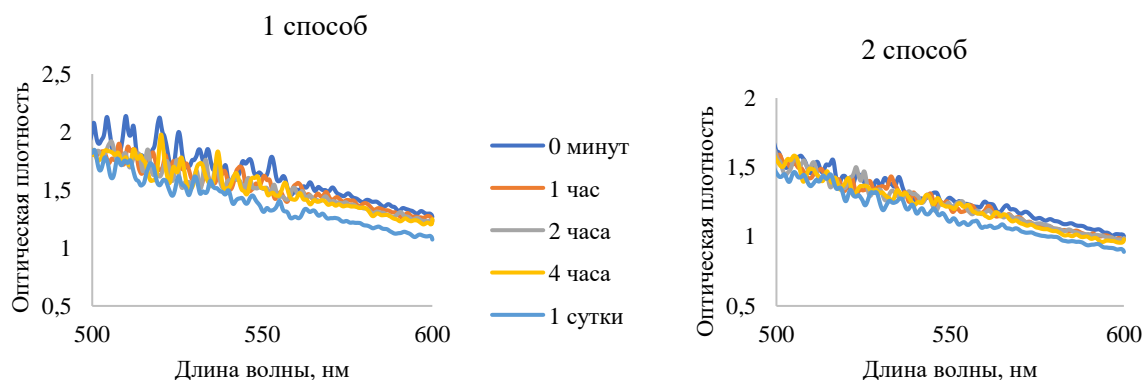
Обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета MS Excel и Origin (OriginLab Corporation, США), статистический анализ проводился с помощью языка R (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Для сравнения независимых выборок использовались тесты Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни, статистически значимыми отличиями считались результаты с параметром $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Диспергирование хитина

3.1.1. Спектрофотометрическое исследование суспензии

На рис. 3.1 представлены спектры оптической плотности суспензии НФХ после её диспергирования. Снижение оптической плотности свидетельствует об образовании агрегатов НФХ. Можно заметить, что время и частота ультразвукового воздействия влияют на устойчивость системы: чем сильнее было воздействие, тем менее выражено падение оптической плотности с течением времени. Данная зависимость проявлялась для всех способов диспергирования, однако особенно сильно было выражено влияние времени, прошедшего после воздействия на суспензию, для 4 способа диспергирования в ультразвуковой ванне, где уже спустя 4 часа наблюдалось снижение оптической плотности. В то же время, суспензия после диспергирования 3 способом оставалась устойчивой даже спустя 1 сутки. При этом при использовании всех режимов не наблюдалось падения оптической плотности суспензии НФХ спустя один час и два часа после её диспергирования, что свидетельствует о сохранении устойчивости по истечении указанных промежутков времени.



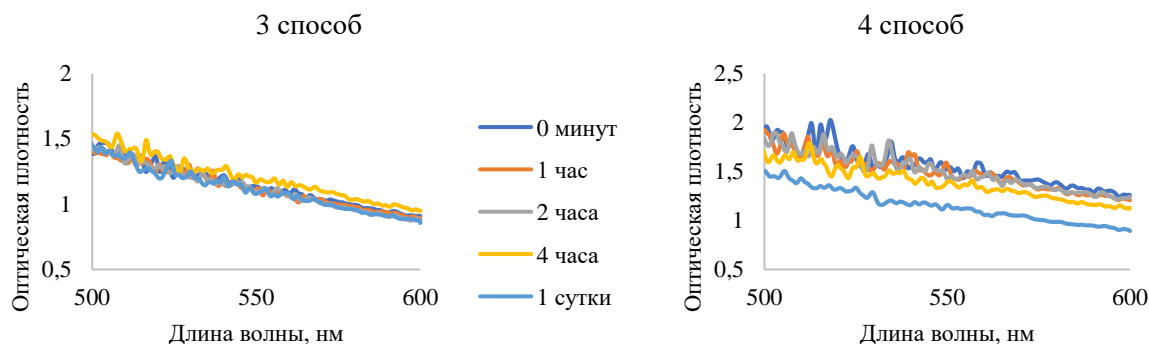


Рис. 3.1. Изменение зависимости оптической плотности суспензии НФХ от длины волны с течением времени.

С учётом полученных данных, для последующего изготовления растворов суспензия НФХ добавлялась к растворам хитозана не позже, чем через 2 часа после её диспергирования.

3.1.2. Спектрофотометрическое исследование растворов

На рис. 3.2 представлены спектры оптической плотности растворов хитозана с добавлением НФХ при различных способах диспергирования суспензии. Максимумы поглощения растворов вне зависимости от используемого режима наблюдались при длинах волн около 237 нм и 270 нм. При длинах волн более 300 нм не наблюдалось влияние увеличения длины волны воздействующего света на оптическую плотность растворов. Можно заметить, что максимальным значением оптической плотности обладали растворы, диспергированные 3 способом – при наиболее сильном воздействии ультразвуком на суспензию. В то же время, использование режима с минимальной мощностью (4 способ) приводило к минимальному поглощению полученных растворов.

Повторное спектрофотометрическое исследование спустя 1 сутки и 1 неделю показывает незначительное снижение оптической плотности растворов, что свидетельствует об их устойчивости. Наиболее сильно было выражено влияние времени при слабых ультразвуковых воздействиях на суспензию НФХ – 1 и 4 способы.

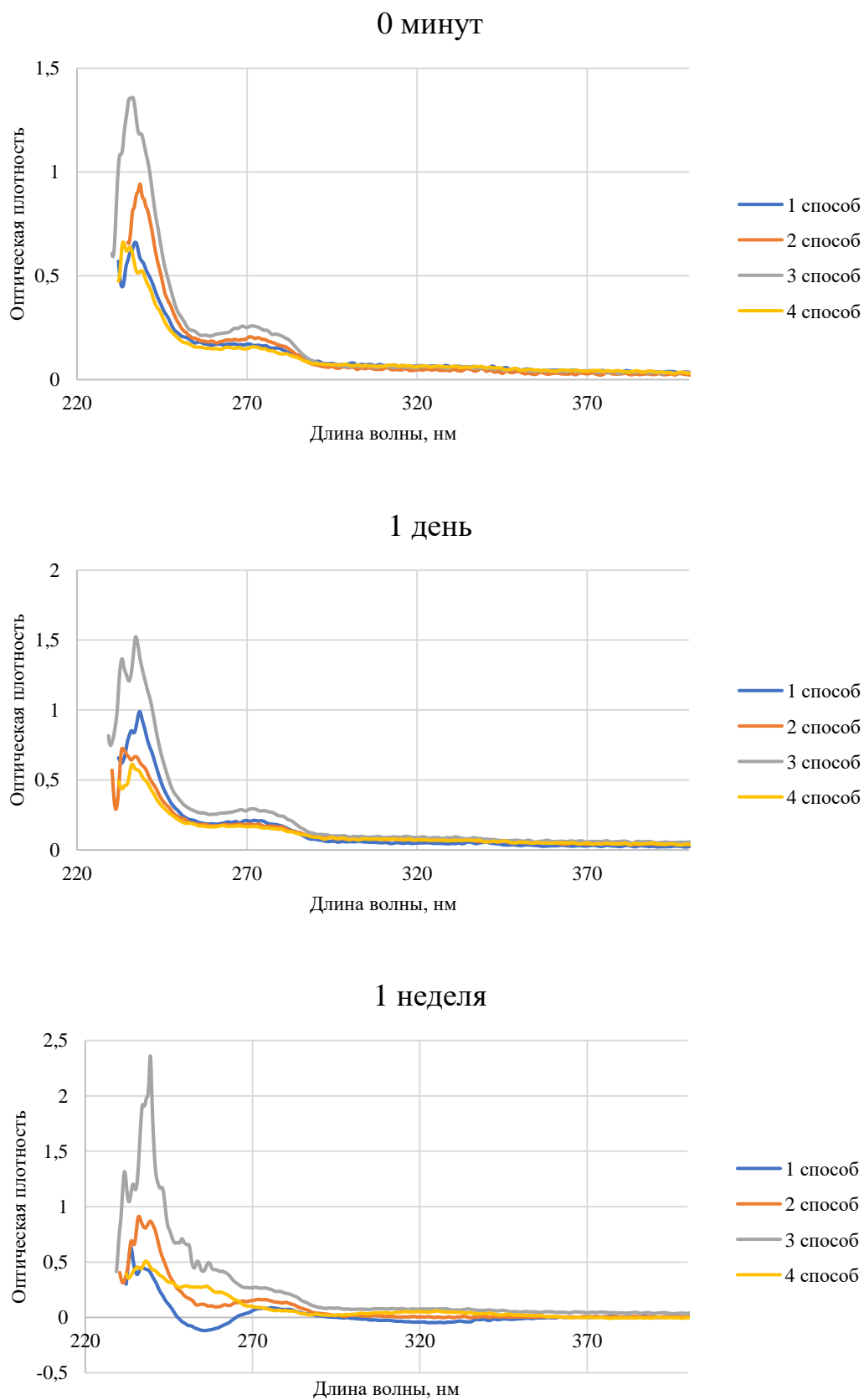


Рис. 3.2. Изменение оптической плотности растворов при различных способах диспергирования с течением времени.

3.1.3. Микроскопическое исследование плёнок

Микроскопическое исследование плёнок с добавлением НФХ, диспергированных различными способами, показало отличия в размерах образующихся агрегатов: увеличение мощности и длительности воздействия сопровождается уменьшением их размеров, что согласуется с измерением оптической плотности растворов, из которых были изготовлены плёнки. Микрофотографии представлены на рис. 3.3. Средний размер агрегатов после диспергирования первым способом составляет 1,8 мкм; вторым – 1,3 мкм; третьим – 1,1 мкм; четвёртым – 2,3 мкм.

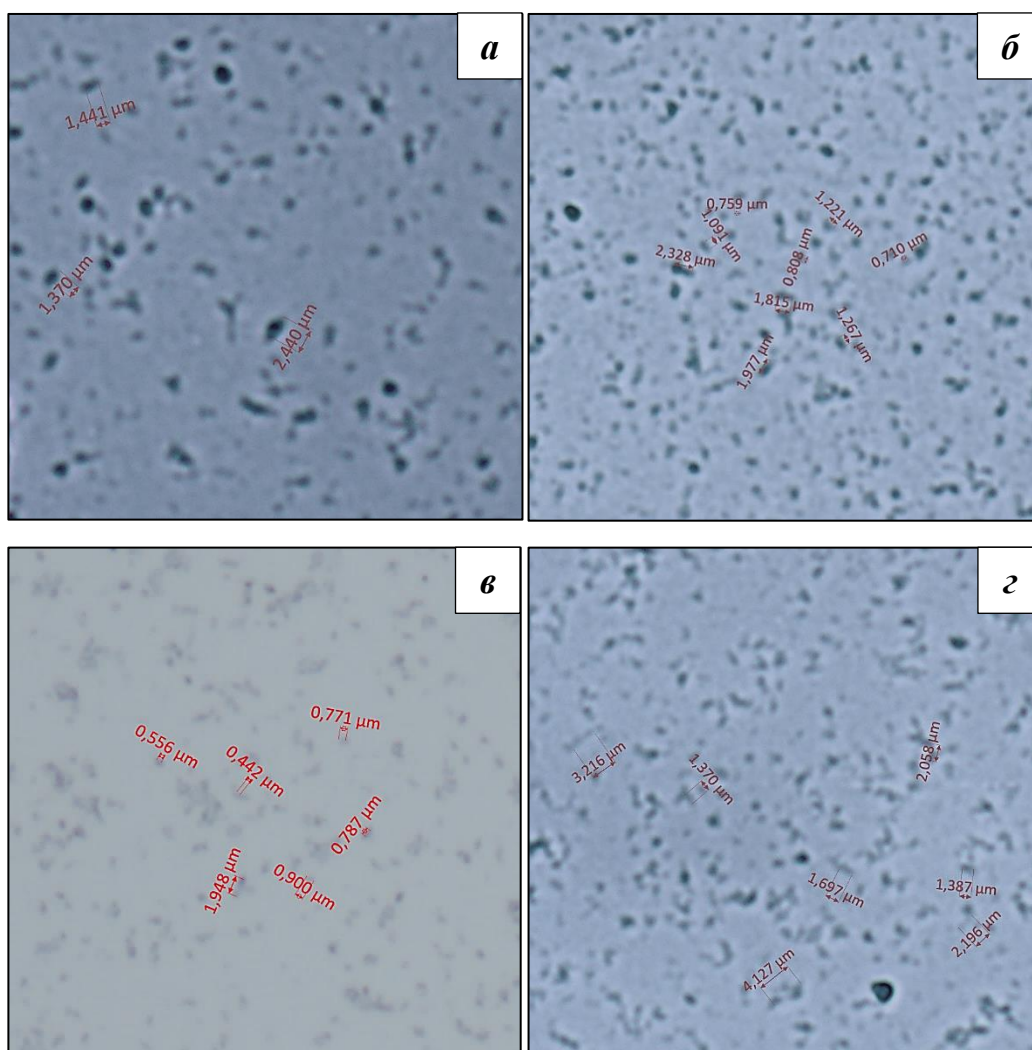


Рис. 3.3. Микрофотографии композиционных плёнок при различном диспергировании хитина: а – 1 способ; б – 2 способ; в – 3 способ; г – 4 способ.

Наименьший размер агрегатов после диспергирования 3 способом является причиной наибольшей гомогенности раствора, в результате чего наблюдается увеличение его оптической плотности при спектрофотометрическом исследовании в сравнении с другими образцами.

3.1.4. Влияние способа диспергирования на механические характеристики волокон

Механические испытания волокон с добавлением НФХ показали наличие зависимости их прочностных характеристик от способа диспергирования (рис. 3.4). Максимальными значениями разрывного напряжения и модуля Юнга обладали волокна, полученные с применением 4 способа диспергирования, заключающегося в воздействии наименьшей мощности, при этом использование различных режимов диспергирования не сказывалось на существенном изменении относительной деформации волокна до разрыва.

Можно предположить, что ультразвуковое воздействие большой мощности сопровождается не только уменьшением размеров агрегатов НФХ, но и частичным разрушением самих наночастиц. В таком случае, использование наименее мощного режима позволяет сохранить структуру наночастиц, обеспечивая наибольшую прочность получаемых волокон. Ввиду этого, дальнейшее получение материалов осуществлялось из хитозана при добавлении суспензии НФХ, диспергированной в ультразвуковой ванне в течение 30 минут при частоте 35 кГц и мощности 130 Вт.

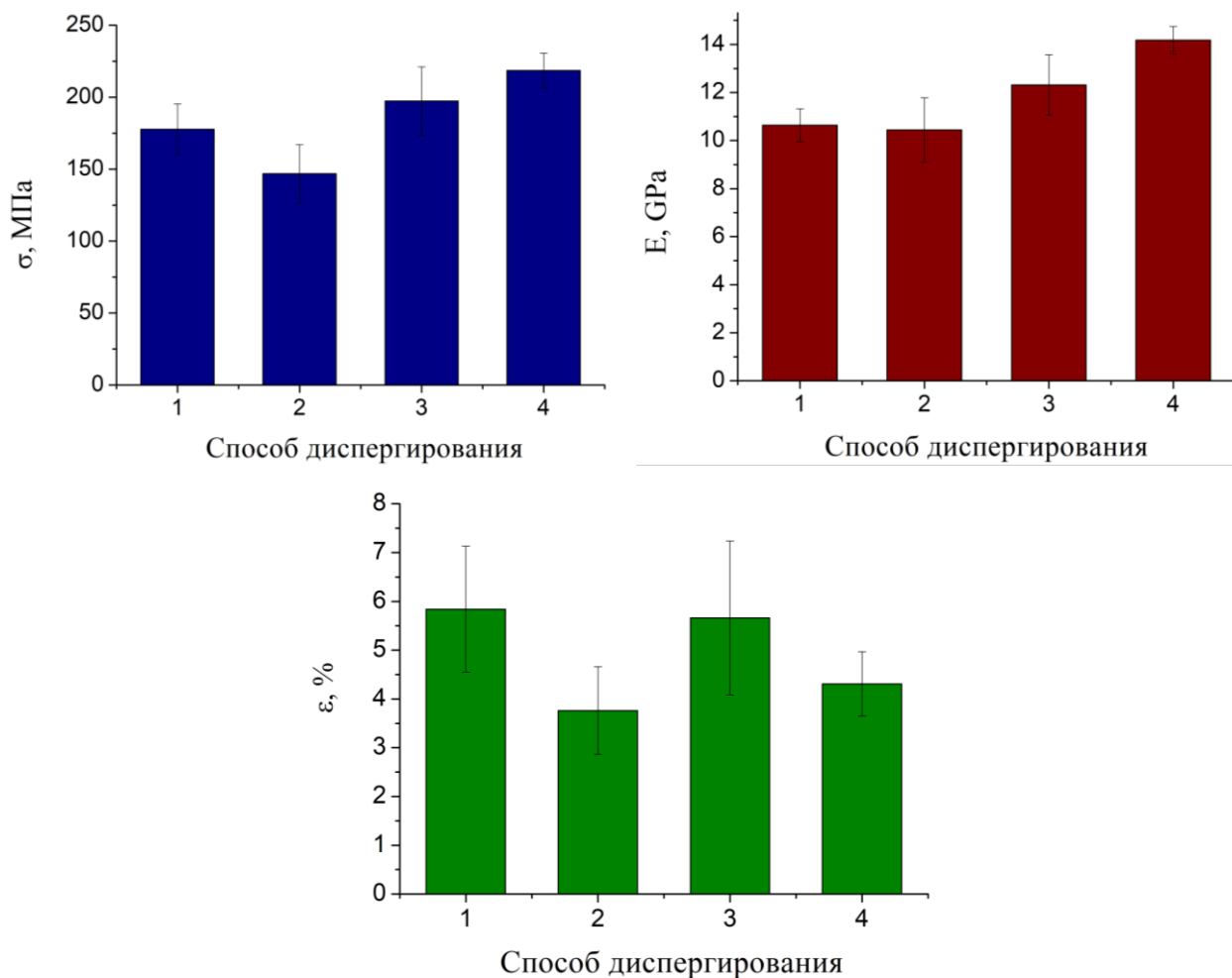


Рис. 3.4. Зависимость разрывного напряжения (σ , МПа), модуля Юнга (E , GPa) и относительной деформации (ϵ , %) волокон в зависимости от способа диспергирования НФХ.

3.2. Реологические свойства растворов хитозана и НФХ

Исследование реологических свойств растворов показало, что все они представляли собой неньютоновские жидкости: увеличение скорости сдвига сопровождалось снижением вязкости растворов (рис. 3.5). Введение малых концентраций НФХ (до 1%) сопровождалось увеличением вязкости раствора, что может свидетельствовать об упрочнении его структуры. В то же время, использование большего количества НФХ приводило к значительному снижению вязкости растворов, что связано с уменьшением содержания основного компонента – хитозана. Так, для раствора с 30% содержанием НФХ зависимость вязкости от скорости сдвига приближалась к линейной. Можно заметить, что вязкость растворов в режиме увеличения скоростей сдвига (Тор)

выше, чем при использовании режима Down, заключающегося в движении в направлении снижения скоростей деформации, что свидетельствует о наличии гистерезиса.

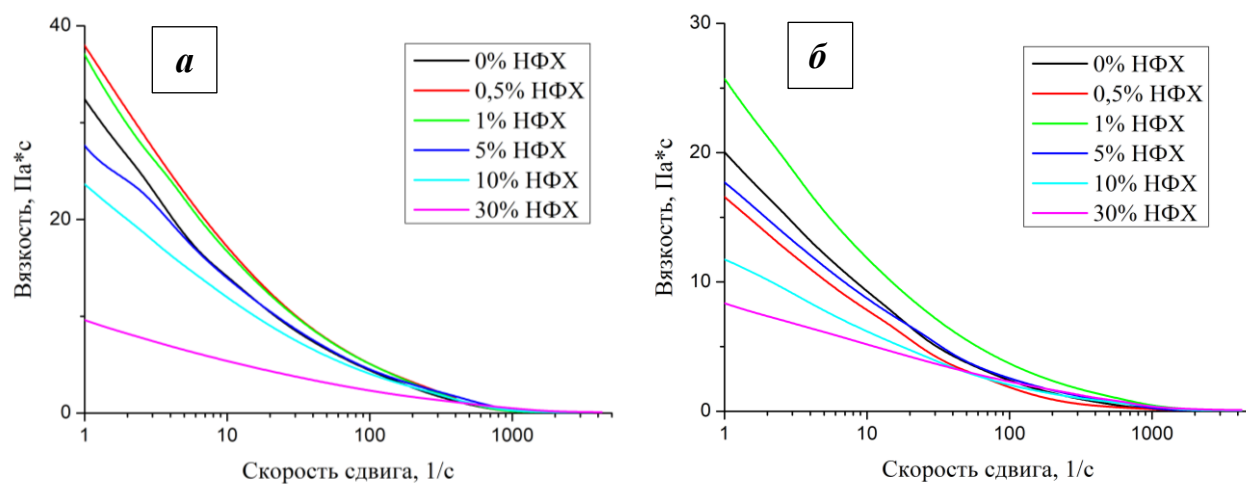


Рис. 3.5. Зависимости вязкости растворов от скорости сдвига в режимах Top (а) и Down (б).

3.3. Влияние на механические характеристики хитозановых волокон введения в них НФХ

На рис. 3.6 представлены зависимости механических характеристик композиционных волокон от содержания в них НФХ. Видно, что введение небольших концентраций НФХ (от 0,1% до 1%) сопровождалось ростом разрывного напряжения и модуля Юнга волокон, однако введение больших концентраций не только не приводило к дальнейшему увеличению прочностных характеристик, но даже способствовало их существенному снижению в сравнении с волокнами из хитозана без НФХ.

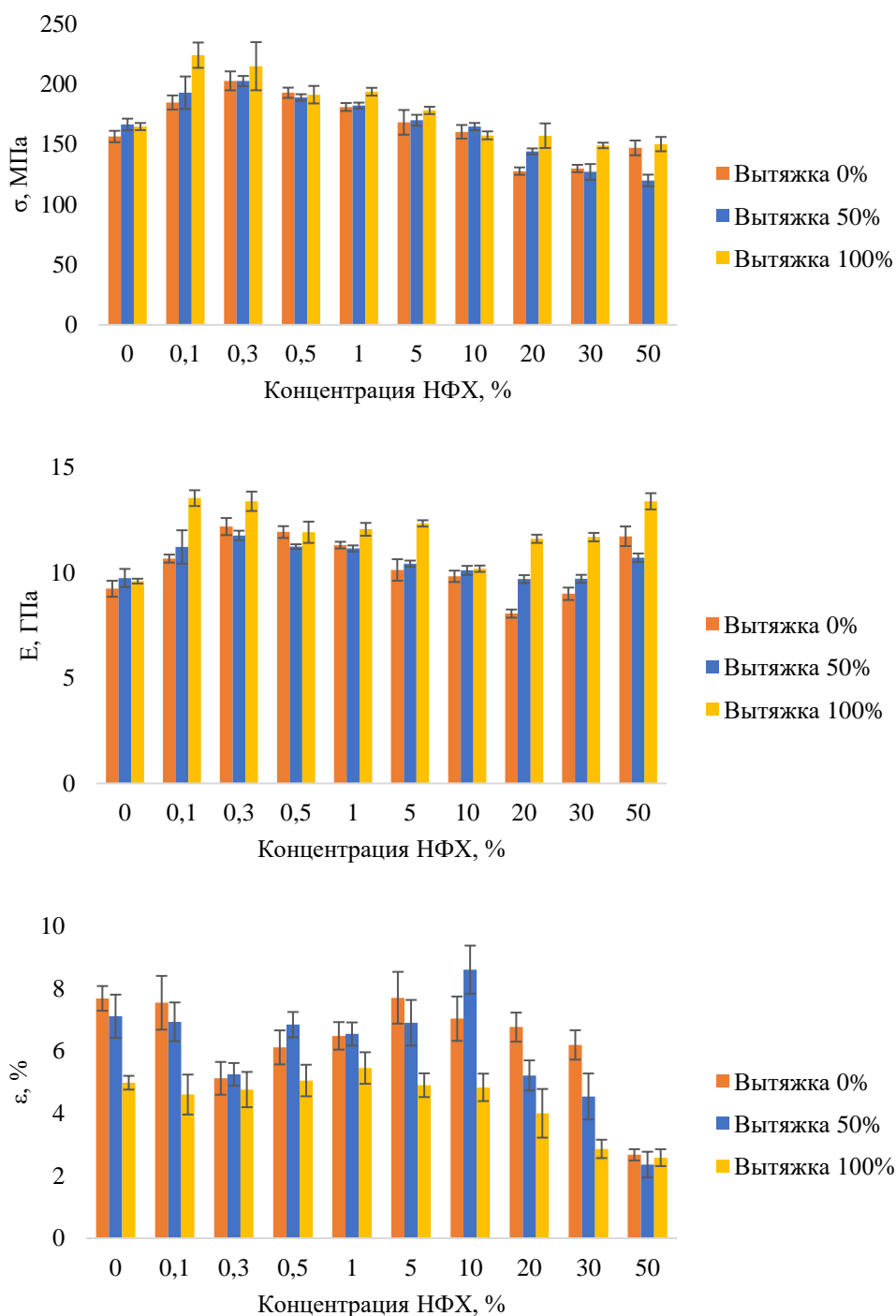


Рис. 3.6. Зависимость разрывного напряжения (σ , МПа), модуля Юнга (E , ГПа) и относительной деформации (ϵ , %) волокон от концентрации НФХ.

Увеличение механических характеристик волокон с малым содержанием НФХ можно объяснить следующим образом. Когда раствор полимера проходит через фильеру, происходит ориентация макромолекул хитозана в направлении потока, которая усиливается при последующей вытяжке волокна в пластификационной ванне (рис. 2.1). Введение малых концентраций НФХ

способствует дополнительной ориентации макромолекул хитозана вдоль нанофибрилл, что приводит к повышению прочности и модуля упругости волокна. В то же время, дальнейшее увеличение концентрации НФХ в растворе выше перколяционного порога, который для НФХ по данным работы [105] составляет $\sim 2\%$, приводит к образованию плотной сетки из нанофибрилл, препятствующих ориентации макромолекул хитозана, и снижению деформационно-прочностных характеристик композиционного волокна. Ещё одной причиной снижения механических характеристик композиционных нитей с большим содержанием НФХ может быть пониженная вязкость растворов при использовании концентрации НФХ более 5%.

Можно заметить, что увеличение вытяжки волокна вне зависимости от количества введенных в хитозан НФХ приводило не только к увеличению его прочности, но, одновременно с этим, и к снижению его деформации до разрыва (охрупчиванию). Для соблюдения баланса между этими характеристиками в дальнейшем для изготовления волокон использовалась вытяжка 50%.

3.4. Влияние влажности среды на механические характеристики волокон

На рис. 3.7 представлены зависимости отношения разрывного напряжения и деформации до разрыва влажных волокон к соответствующим характеристикам абсолютно сухих волокон ($\sigma/\sigma(0)$ и $\varepsilon/\varepsilon(0)$ соответственно) для различных концентраций НФХ от относительного давления водяного пара в эксикаторах. Видно, что увеличение концентрации НФХ приводит к увеличению относительной прочности волокон за счёт меньшего поглощения влаги. Наиболее сильное сопротивление воздействию влажности среды наблюдается у волокон с 50%-м содержанием НФХ, у которых отсутствует потеря прочности при относительном давлении водяного пара вплоть до 84%. Дальнейшее повышение относительного давления приводит к снижению механических характеристик для всех материалов, независимо от содержания наполнителя. Следует отметить, что концентрация НФХ 0,5% выделяется из-

за низкой потери прочности волокон, в то время как другие концентрации НФХ (5% и 30%) незначительно отличаются друг от друга и от хитозана без добавления НФХ. При этом с точки зрения деформационных характеристик введение в растворы хитозана больших количеств НФХ не приводит к увеличению сопротивления воздействию влаги, исключением является 5% концентрация НФХ.

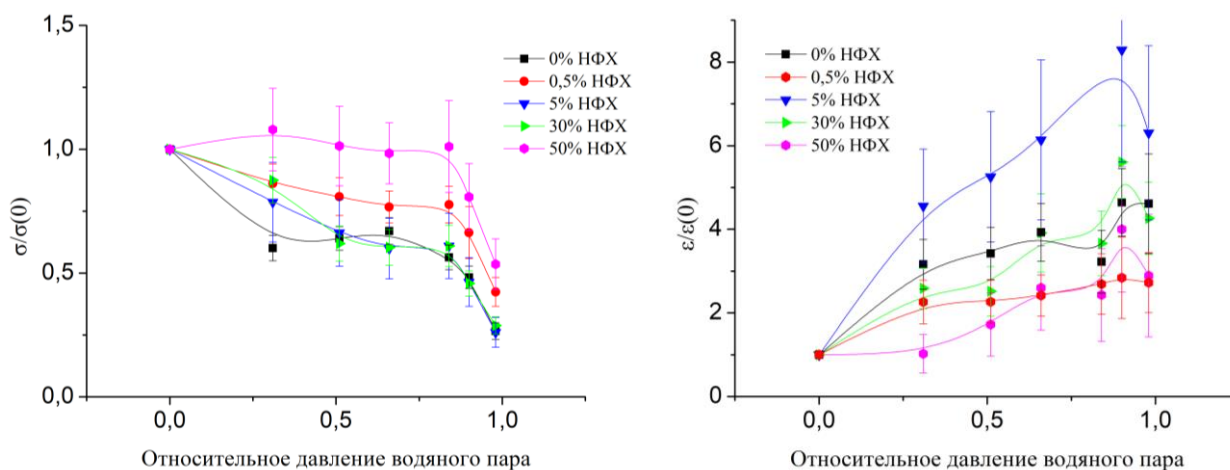


Рис. 3.7. Зависимости относительного разрывного напряжения $\sigma/\sigma(0)$ и деформации до разрыва $\varepsilon/\varepsilon(0)$ от давления водяного пара в эксикаторах.

В работах [6, 89] было показано, что добавление НФХ в растворы хитозана приводит к снижению сорбционных характеристик материала за счёт увеличения упорядоченности композиционных материалов, формирования более плотной упаковки макромолекул хитозана в адсорбционном слое на поверхности НФХ с образованием мезофазы жидкокристаллического типа из макромолекул хитозана. Это может быть объяснением снижения влияния относительного давления в эксикаторах на механические свойства волокон с добавлением НФХ, что приводит к уменьшению потерь прочности при увеличении относительного давления для волокон с высокой концентрацией НФХ.

3.5. Сорбционные характеристики композиционных волокон

Изотермы сорбции представлены на рис. 3.8. Точками на графике представлены экспериментальные значения, линиями – расчётные. Их совпадение

говорит о возможности оценивать сорбционную способность волокон на основе хитозана с добавлением НФХ с помощью использованной модели, рассчитанной по термическому уравнению сорбции.

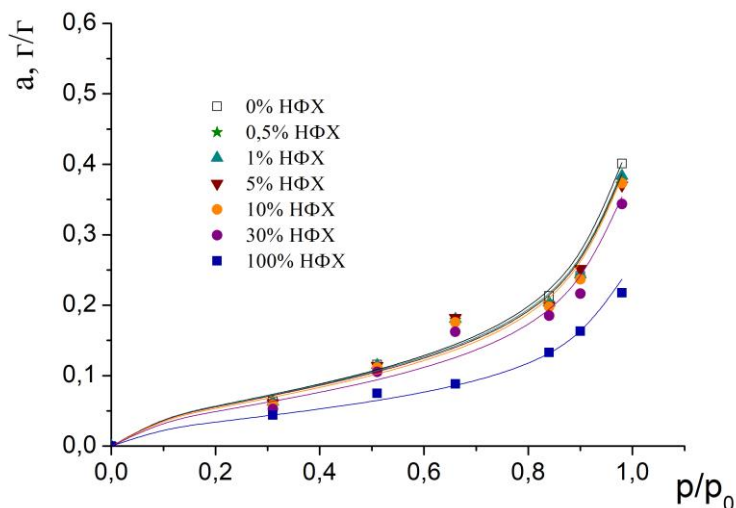


Рис. 3.8. Изотермы сорбции волокон с различным содержанием НФХ.

Все полученные зависимости имеют одинаковый характер, типичный для полимеров, набухающих в парах воды. Перегиб кривой свидетельствует о переходе аморфных частей полимеров в высокоэластическое состояние. Кривая, соответствующая хитину (100% НФХ), лежит значительно ниже остальных, что говорит о его меньшей сорбционной способности за счёт более упорядоченной структуры и высокой кристалличности [6] и связано с гидрофобной природой наночастиц хитина [5]. Максимальной сорбционной способностью обладает хитозан, при этом введение НФХ в концентрациях до 10% слабо сказывается на изменении способности волокон к сорбции водяных паров.

В статье [105] с использованием методов молекулярной динамики было показано наличие хорошего взаимодействия между хитозаном и НФХ. Расположение макромолекул хитозана вдоль НФХ при формировании волокон по мокрому способу является наиболее энергетически выгодным и, таким образом, введение НФХ способствует упорядочиванию и дополнительной ориентации макромолекул хитозана вдоль оси волокна.

Взаимное упорядочение компонентов смеси способствует образованию между ними водородных связей и, как следствие, более стабильной и энергетически выгодной структуры. При этом, ввиду высокого термодинамического сродства хитозана и хитина [3], хитозан будет адсорбироваться на поверхности наночастиц хитина [6], образуя более плотную упаковку макромолекул. Нельзя исключить самоорганизацию макромолекул хитозана в адсорбционном слое на поверхности хитина в мезофазу жидкокристаллического типа, недоступную для воды при дальнейшей абсорбции водяного пара композиционным материалом [98].

3.6. Измерение дзета-потенциала нетканых материалов

Для изучения возможных причин различий в гемостатическом действии нетканых материалов на основе хитозана с добавлением НФХ и без них было проведено измерение их дзета-потенциала при различных значениях рН (рис. 3.9). Можно заметить, что изоэлектрическая точка обоих материалов находится в диапазоне рН 8,0-8,5, однако введение НФХ в количестве 0,5% приводит к повышению потенциала поверхности композиционного материала при меньших значениях кислотности среды.

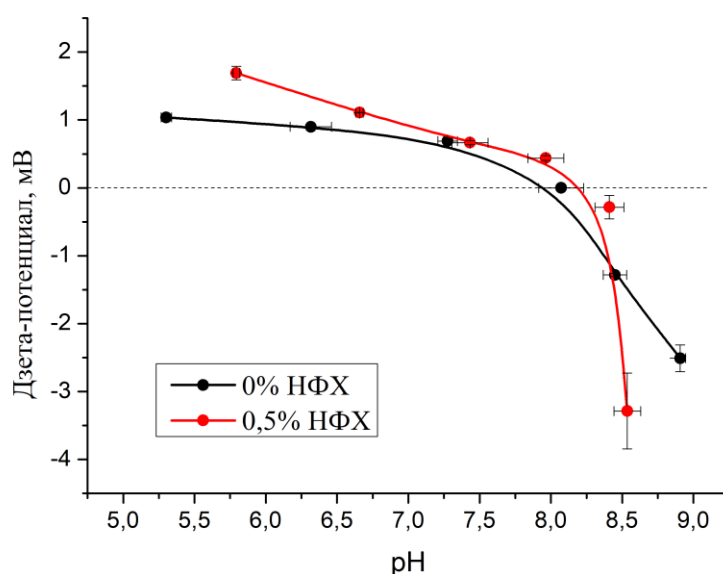


Рис. 3.9. Зависимость дзета-потенциала нетканых материалов от значения рН.

Известно [105], что хитозан обладает полиэлектролитными свойствами. В растворах слабых кислот аминогруппа NH_2 переходит в положительно заряженную NH_3^+ , а гидроксильные и аминогруппы хитозана образуют внутри- и межмолекулярные водородные связи. Можно предположить, что упорядоченность макромолекул хитозана в композиционном волокне, в частности, их взаимная ориентация, а также ориентация относительно НФХ, будут влиять на количество водородных связей и, как следствие, на величину поверхностного заряда волокна. Распрямленная конформация макромолекул будет снижать вероятность образования внутримолекулярных связей хитозана, тем самым повышать свободный поверхностный заряд волокна.

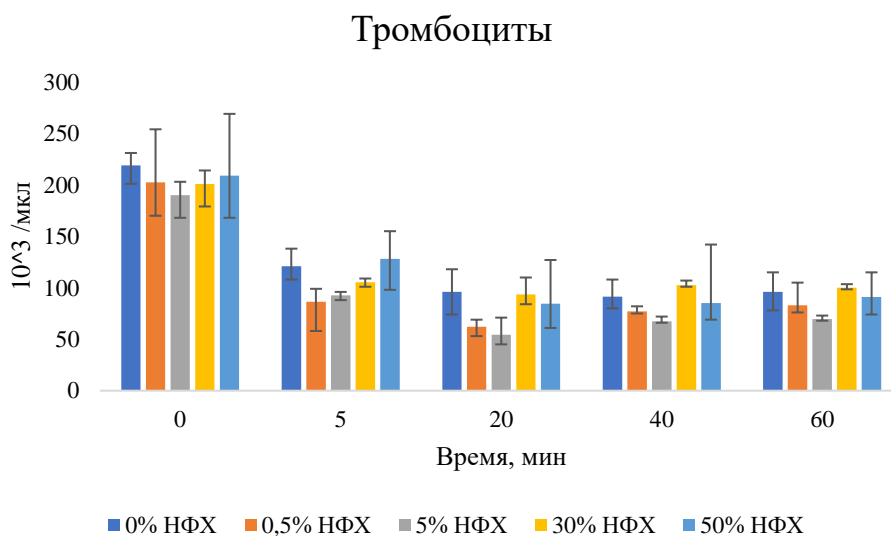
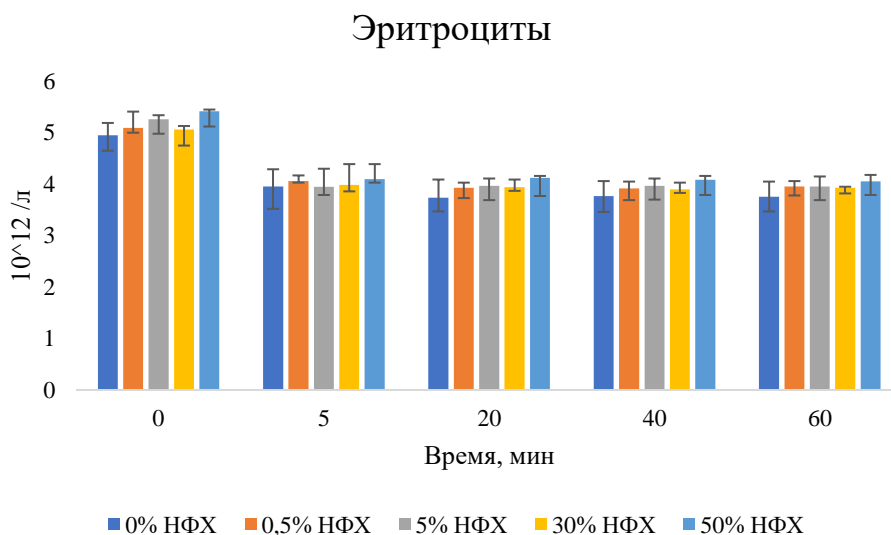
Увеличение дзета-потенциала и его резкое снижение при достижении изоэлектрической точки может быть связано с большей упорядоченностью структуры поверхности композиционных волокон и более регулярным расположением положительно заряженных групп. Как упоминалось ранее, в работе [105] с использованием методов молекулярной динамики было показано, что наиболее выгодным является расположение макромолекул хитозана вдоль НФХ. Это приводит к образованию более ориентированной структуры в процессе получения волокон, что, в свою очередь, сопровождается регулярным расположением положительных зарядов и минимизацией их взаимодействия с другими группами макромолекул хитозана и хитина. Резкое падение величины дзета-потенциала при значениях рН больше 8 также может являться подтверждением наличия большей упорядоченности заряженных групп композиционных волокон, и, как следствие, более узкого распределения величины зарядов.

Наличие большего положительного заряда у композиционного нетканого материала может быть причиной его лучшего взаимодействия с отрицательно заряженными клетками крови. Надо отметить, что электростатическое взаимодействие хитозана за счёт его положительного заряда с эритроцитами и тромбоцитами является одним из основных механизмов его гемостатического действия. Таким образом, увеличение положительного заряда материа-

ла за счёт введения НФХ может способствовать усилению его кровеостанавливающих свойств.

3.7. Контакт композиционных волокон с кровью *in vitro*

На рис. 3.10 приведены изменения клеточного состава крови с течением времени. Для всех исследуемых образцов наблюдалось достоверное снижение количества эритроцитов в крови спустя пять минут после начала контакта с препаратом. Ввиду того, что в дальнейшем их количество оставалось на постоянном уровне, можно предположить, что это связано с разбавлением крови физиологическим раствором, который оставался между волокнами после их промывания, за счёт наличия свободного объёма в колонке.



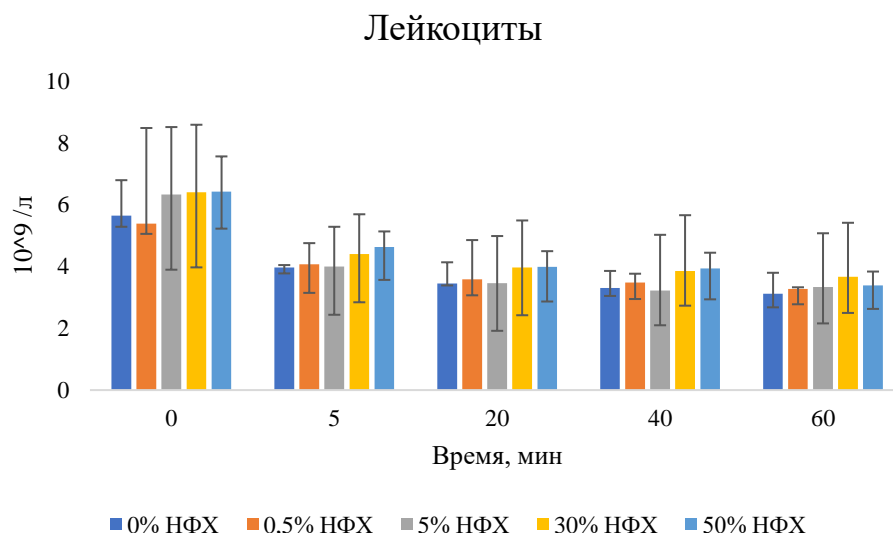


Рис. 3.10. Изменения количества эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов в крови при контакте с волокнами с течением времени

В то же время, снижение количества тромбоцитов и лейкоцитов не может быть объяснено лишь разбавлением крови физиологическим раствором, вследствие чего можно судить об их взаимодействии с волокнами за счёт адгезии клеток крови. Наиболее сильно данный процесс был выражен при взаимодействии тромбоцитов с материалом в первые 20 минут контакта с кровью. Учитывая эти результаты и тот факт, что тромбоциты играют особо важную роль в процессе гемостаза, длительность которого может достигать десяти минут, была рассчитана скорость их адгезии в промежутках времени 0-5 и 5-20 минут (рис. 3.11).

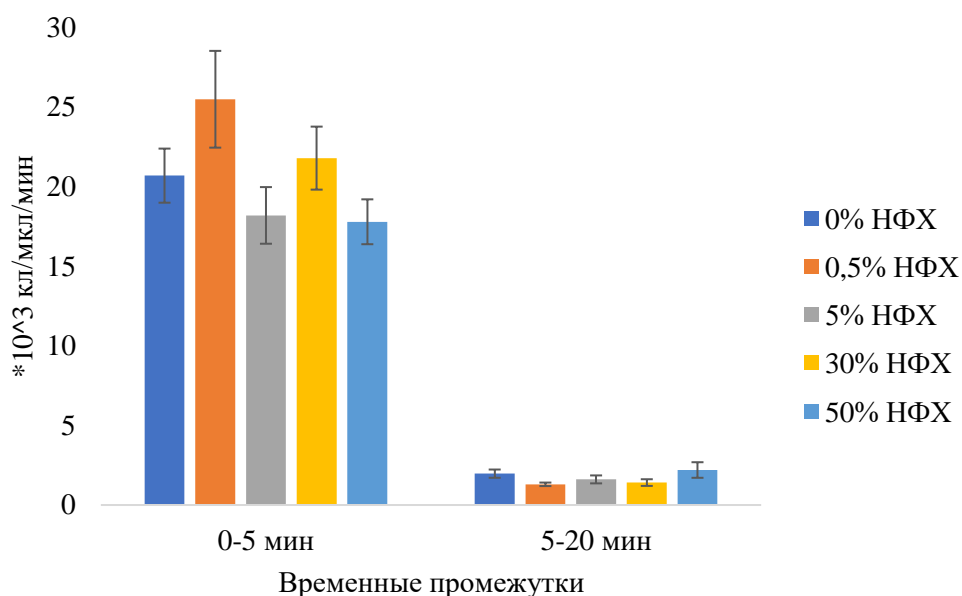


Рис. 3.11. Изменения адгезии тромбоцитов с течением времени для волокон с различным содержанием НФХ.

Можно заметить, что в первые пять минут контакта адгезия тромбоцитов при взаимодействии с волокнами была максимальна, после чего заметно снижалась. Среди всех исследуемых образцов выделяется концентрация НФХ 0,5% ввиду наибольшей скорости адгезии в сравнении с другими концентрациями НФХ. Данные результаты позволяют предположить наличие кровеостанавливающих свойств у материалов на основе хитозана с добавлением НФХ, которые могут быть проявлены наиболее сильно в случае использовании концентрации НФХ в количестве 0,5%.

На рис. 3.12 и 3.13 представлены значения отношения оптической плотности крови после контакта с материалом к оптической плотности пробы до контакта при длинах волн 414 нм и 540 нм соответственно. Взаимодействие крови с волокнами в первые пять минут приводило к падению оптической плотности для всех образцов, что может быть связано с сорбцией на них молекул гемоглобина.

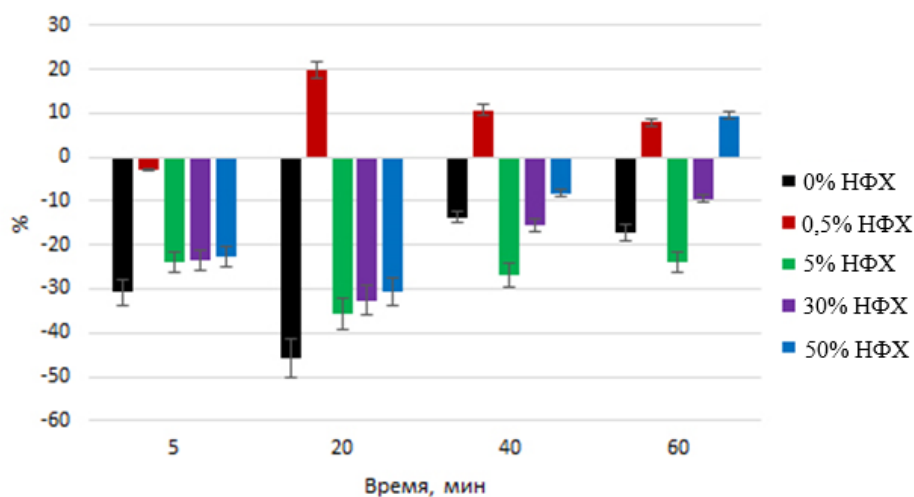


Рис. 3.12. Изменение оптической плотности плазмы крови при контакте с волокнами при длине волны 414 нм.

При использовании падающего света с длиной волны 414 нм (рис. 3.12) на фоне остальных образцов опять же резко выделяется концентрация НФХ 0,5%: при взаимодействии крови с волокнами дольше пяти минут значение оптической плотности, в отличие от использования других концентраций, возрастало, что свидетельствует о преобладании процессов гемолиза над процессами сорбции гемоглобина. Таким образом, волокна хитозана с 0,5% содержанием НФХ являются наименее гемосовместимыми по сравнению с остальными исследуемыми образцами.

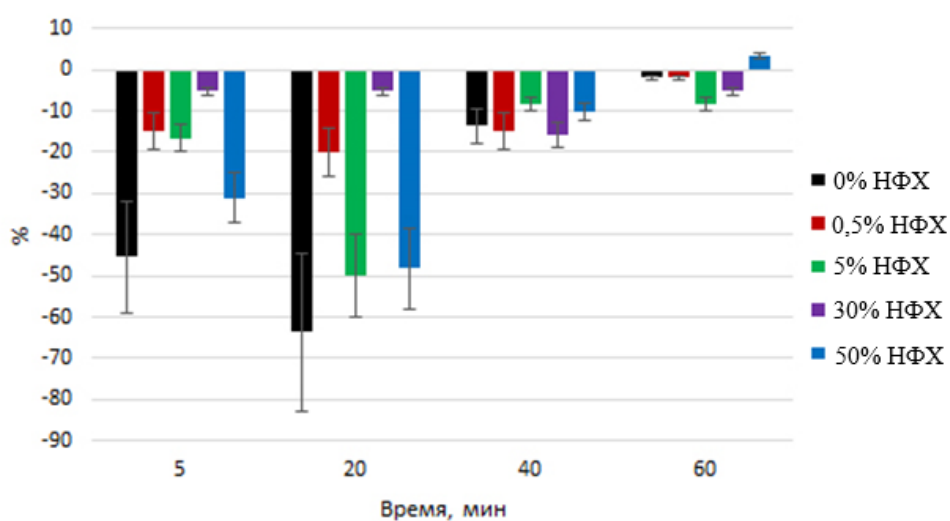


Рис. 3.13. Изменение оптической плотности плазмы крови при контакте с волокнами при длине волны 540 нм.

При длине волны 540 нм (рис. 3.13) контакт крови со всеми материалами сопровождался снижением оптической плотности относительно контрольной пробы. Единственным исключением была проба крови, контактирующая в течение часа с волокнами с 50% содержанием НФХ, в которой гемолиз эритроцитов слабо преобладал над процессами сорбции. Так же, как и для длины волны 414 нм, наибольшей сорбционной активностью, а, следовательно, и наилучшей гемосовместимостью, обладали волокна хитозана без введения НФХ.

Результаты данных экспериментов позволяют выдвинуть предположение о положительном влиянии введения НФХ в растворы хитозана на кровоостанавливающие свойства получаемых материалов. Особенно сильно это проявляется в случае использования волокон с добавлением НФХ в концентрации 0,5%, при исследовании которых наблюдались максимальная адгезия тромбоцитов и увеличение оптической плотности крови после контакта с образцом.

3.8. Измерение впитывающей способности губок

Способность материала к впитыванию крови является важным свойством потенциального гемостатического агента. Для оценки данной характеристики композиционные губки различного размера и с содержанием НФХ в диапазоне концентраций от 0% до 50% приводились в контакт с кровью. Результаты данного эксперимента представлены на рис. 3.14.

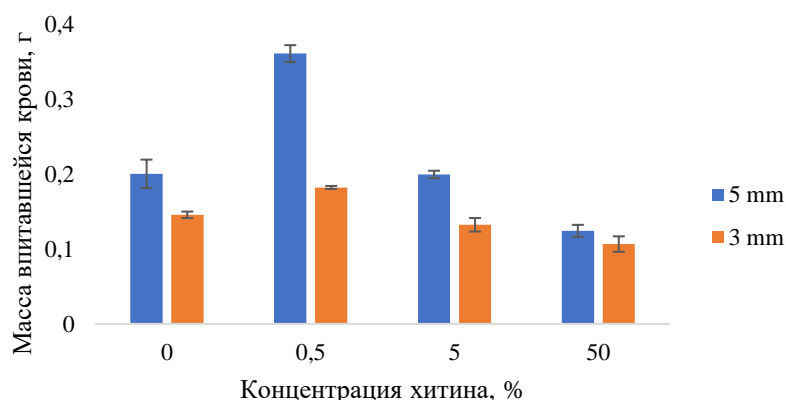


Рис. 3.14. Зависимость впитывающей способности губок от концентрации НФХ.

Для всех исследуемых образцов увеличение высоты губки способствовало большей сорбции крови вне зависимости от содержания НФХ. Наибольшее значение массы впитавшейся крови продемонстрировали губки с концентрацией НФХ 0,5%. Пик для данной концентрации наблюдался для обоих размеров губок, однако наибольшего значения достигал при высоте губки 5 мм. В связи с полученными данными, можно предположить, что использование материалов на основе хитозана с добавлением 0,5% НФХ для последующей остановки кровотечений будет наиболее эффективно.

3.9. Гистологическое исследование имплантированных композиционных волокон

1) Группа внутримышечного введения

На 14 сутки наблюдения при гистологическом исследовании вокруг эозинофильно окрашенных имплантированных волокон наблюдалась нешироким ободком воспалительная инфильтрация, представленная лимфоцитами, макрофагами с примесью немногочисленных нейтрофильных лейкоцитов. Кроме того, в состав инфильтратов входили единичные в поле зрения гигантские многоядерные клетки типа инородных тел. Наибольшее число нейтрофильных лейкоцитов в составе инфильтрата определялось при имплантации волокон с 30% содержанием НФХ, где гигантские многоядерные клетки типа инородных тел имели наибольшие размеры (рис 3.15, а).

На 28 сутки воспалительные инфильтраты вокруг инородных тел были представлены в скудном объеме и состояли исключительно из лимфоцитов и макрофагов. Кроме того, выявлялось формирование тонкой грубоволокнистой соединительнотканной капсулы вокруг волокон. Наибольший объем воспалительной инфильтрации и соединительной ткани выявлялся при использовании волокон с добавлением 0,5% НФХ. Ни в одной из групп гигантские многоядерные клетки не были обнаружены.

На 91 сутки в исследованных гистологических препаратах отмечалось формирование тонкой грубоволокнистой капсулы вокруг волокон. Наиболее

широкий слой рубцовой ткани выявлялся при имплантации материалов с концентрациями НФХ 0,5% и 30%, причём в случае последней среди волокон соединительной ткани обнаруживались единичные нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты (рис 3.15, б). Ни в одной из групп гигантские многоядерные клетки не были обнаружены.

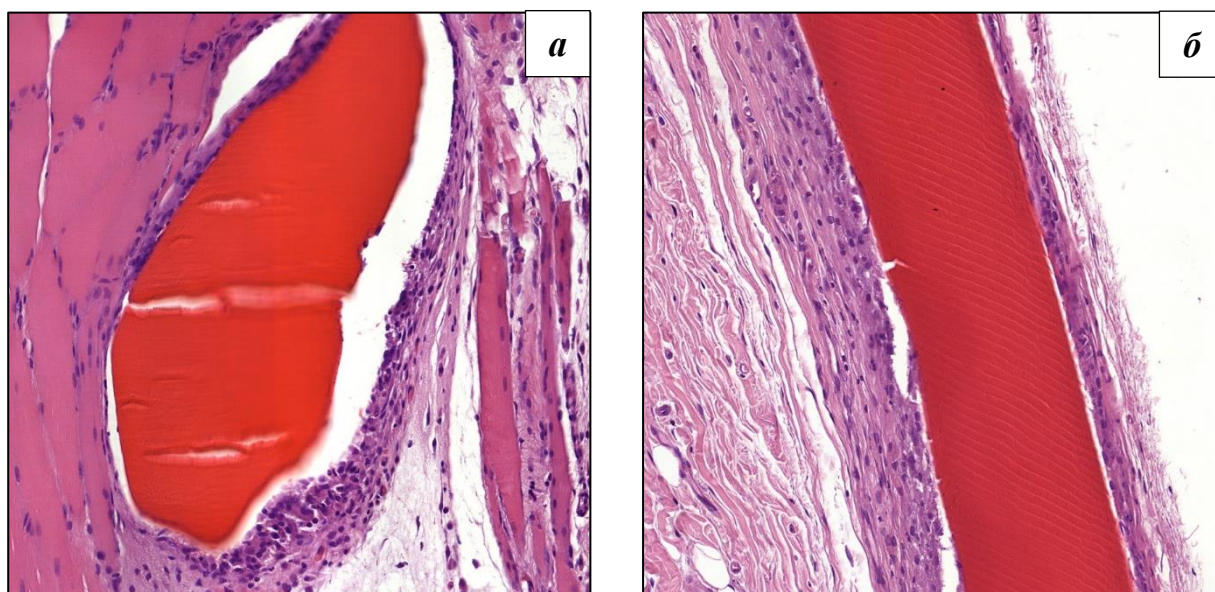


Рис. 3.15. Гистологические микрофотографии волокон хитозана с добавлением 30% НФХ, увеличение $\times 200$: а – 14 суток; б – 91 сутки.

2) Группа субфасциального введения

На 14 сутки вокруг инородных тел так же определялась нешироким слоем воспалительная инфильтрация, представленная лимфоцитами, макрофагами с примесью немногочисленных нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов. Слабее всего было выражено воспаление при концентрации НФХ 0,5% (рис. 3.16, а); в случае использования волокон без добавления НФХ в составе инфильтратов наблюдались немногочисленные, сгруппированные тучные клетки. Наряду с этим, вокруг волокон с 30% НФХ отмечались единичные гигантские многоядерные клетки типа инородных тел, плотно прилежащие к исследуемому материалу.

В гистологических препаратах на 28 сутки наблюдения воспалительные инфильтраты вокруг инородных тел были представлены в скудном объеме и

состояли из лимфоцитов и макрофагов с примесью единичных в поле зрения нейтрофильных лейкоцитов. Также выявлялось формирование тонкой грубоволокнистой соединительнотканной капсулы вокруг материалов. При введении 0,5% НФХ отмечались единичные гигантские многоядерные клетки типа инородных тел, а для 30% НФХ – гигантоклеточная гранулёма, плотно прилегающая к шовному материалу.

На 91 сутки в исследованных образцах отмечалось формирование тонкой грубоволокнистой капсулы вокруг инородных тел (рис. 3.16, б). В группе с 30% содержанием НФХ рубцовая ткань умеренно инфильтрирована лимфоцитами, макрофагами с примесью немногочисленных нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов. Ни в одной из групп гигантские многоядерные клетки не были обнаружены.

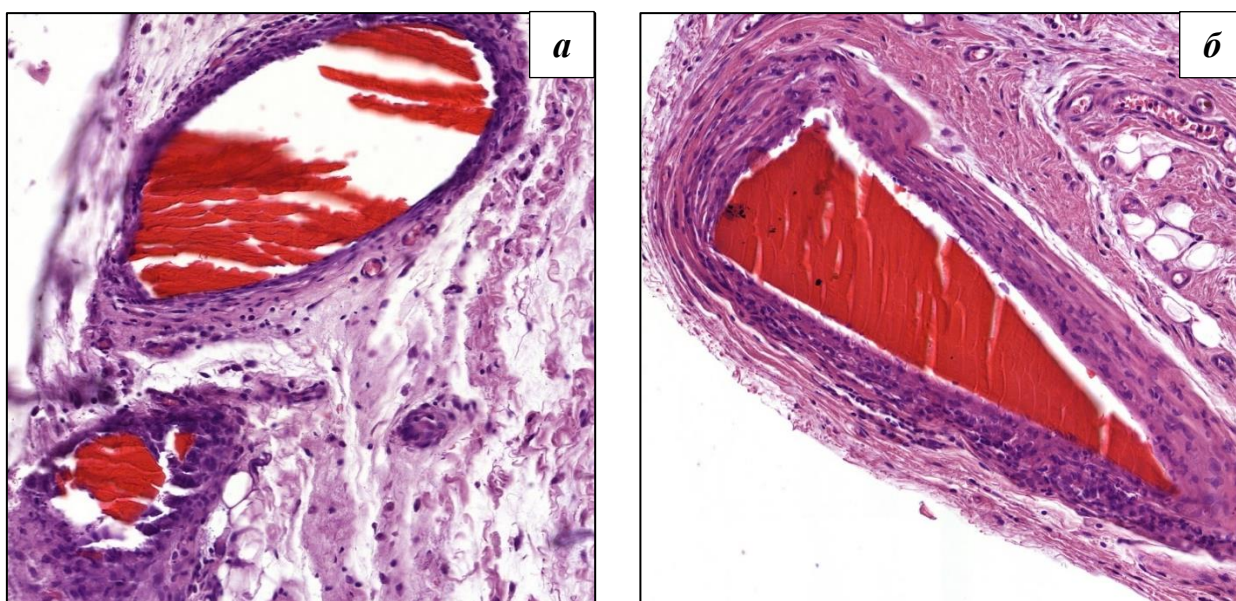


Рис. 3.16. Гистологические микрофотографии волокон хитозана с добавлением 0,5% НФХ, увеличение x200: а – 14 суток; б – 91 сутки.

Полученные в ходе гистологического исследования данные свидетельствуют о биоинертности композиционных волокон при субфасциальном и внутримышечном введении. Даже на 14 сутки имплантации материалов вокруг них наблюдалось слабое воспаление, которое уменьшалось при более длительном нахождении в организме. При этом введение НФХ слабо сказывалось на реакции прилежащих тканей,

только в случае использования волокон с 30% концентрацией НФХ вокруг них наблюдалось наибольшее число гигантских многоядерных клеток. Образование плотной соединительнотканной капсулы вокруг всех имплантированных материалов к 91 суткам свидетельствует об отсутствии процессов резорбции вне зависимости от группы введения и содержания НФХ.

3.10. Исследование биорезорбции волокон методом оптической микроскопии

Для исследования резорбции композиционных волокон после их имплантации они были очищены от прилежащих тканей и изучены с помощью метода оптической микроскопии. Характер изменения структуры волокон не зависел от места их имплантации (субфасциально или внутримышечно в *m. latissimus dorsi*), а также от используемой концентрации НФХ, ввиду чего ниже представлены микрофотографии только с минимальным и максимальным содержанием НФХ среди исследуемых концентраций. Спустя две недели нахождения образцов в организме наблюдались слабые следы их фрагментации, выраженные в присутствии небольших трещин на поверхности (рис. 3.17).

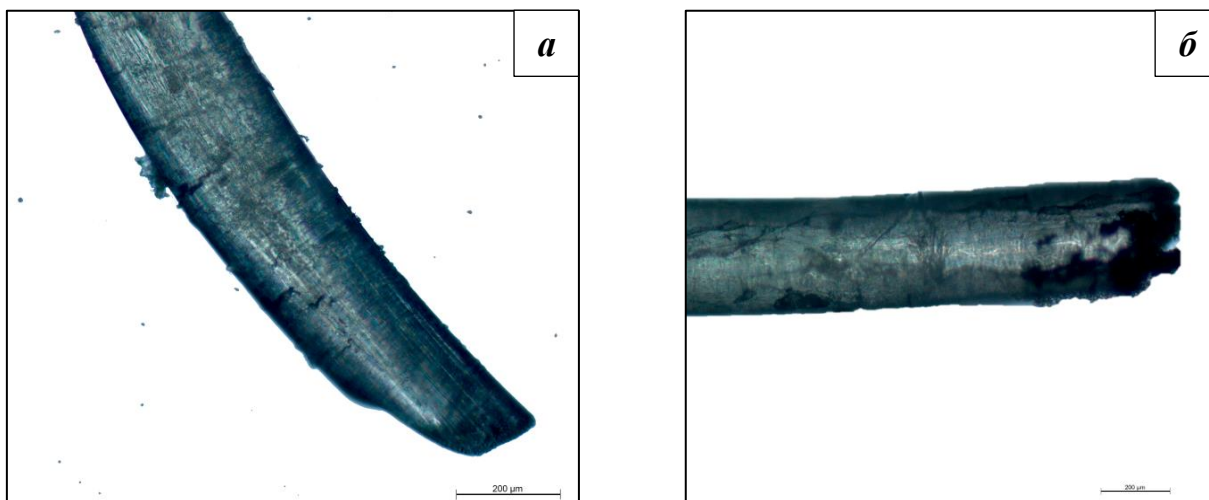


Рис. 3.17. Микрофотографии волокон хитозана с добавлением 0,5% (а) и 30% НФХ (б) после имплантации под фасцию *m. latissimus dorsi* на 14 суток.

На 91 сутки эксперимента (рис. 3.18) вокруг имплантируемых волокон образовывалась плотная соединительнотканная капсула, что согласуется с результатами гистологического исследования. Несмотря на частичную фрагментацию, образовавшиеся куски материала капсулой удерживались вместе. Таким образом, можно судить о наличии слабых следов резорбции материалов на основе хитозана с добавлением НФХ, что, однако, может быть сопряжено с механическими нагрузками из-за движений подопытных животных ввиду их близкого расположения к мышце. При этом используемая концентрация НФХ не влияла на видимую с помощью оптического микроскопа степень резорбции.

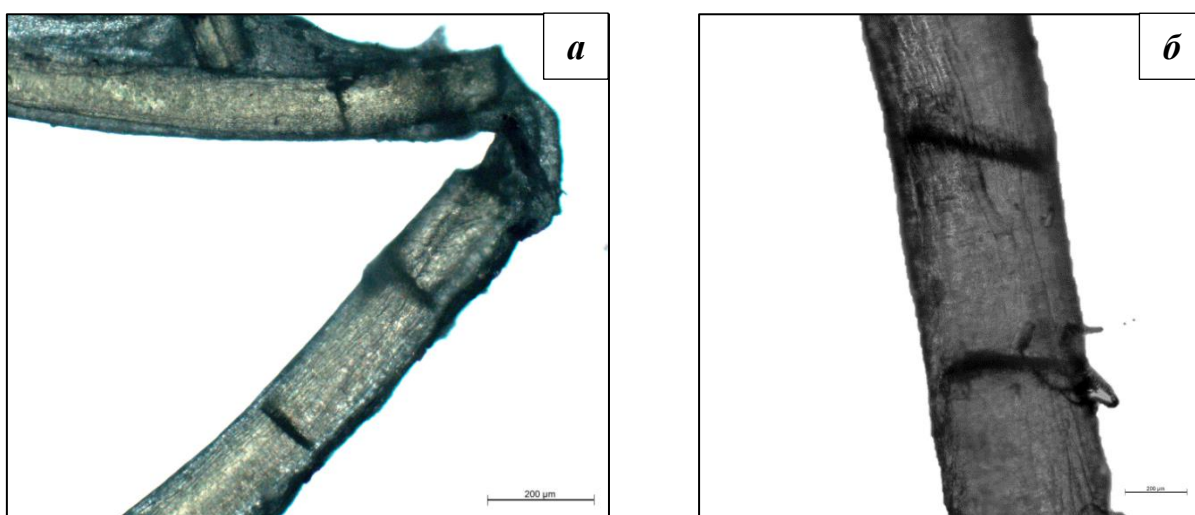


Рис. 3.18. Микрофотографии волокон хитозана с добавлением 0,5% (а) и 30% НФХ (б) после имплантации под фасцию *m. latissimus dorsi* на 91 сутки.

3.11. Испытания гемостатических свойств материалов

Первый этап испытания гемостатических свойств материалов заключался в измерении скорости остановки артериального кровотечения губками с различным содержанием НФХ (рис. 3.19). Можно заметить, что все материалы продемонстрировали наличие гемостатических свойств ввиду меньшего времени остановки кровотечения в сравнении с контрольной группой (без применения кровеостанавливающих препаратов). Наименьшее время было достигнуто при использовании хитозановой губки с 0,5% содержанием НФХ.

В связи с этим, а также с учётом результатов предыдущих испытаний, нетканый материал был изготовлен при использовании данной концентрации.

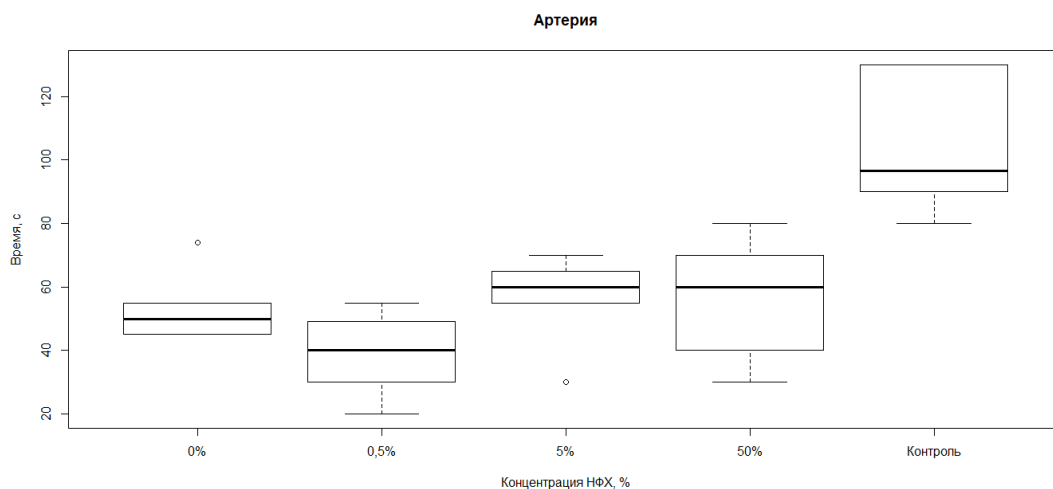


Рис. 3.19. Время остановки кровотечения губками с различным содержанием НФХ.

Испытания нетканых материалов (группы «НМ» на графике) проводились в сравнении с губкой с 0,5% содержанием НФХ, двумя коммерчески доступными гемостатическими агентами с различными механизмами действия (Surgicel Nu-Knit и Tachocomb), а также при остановке кровотечения без использования каких-либо материалов – группа «Контроль» (рис. 3.20). При моделировании артериального кровотечения только нетканый материал с добавлением 0,5% НФХ сравнился по эффективности с губкой той же концентрации, однако при остановке кровотечения из бедренной вены все материалы продемонстрировали лучший результат, чем при использовании губки. В обоих случаях нетканый материал с добавлением 0,5% НФХ оказался сравнимым по скорости достижения гемостаза с коммерческими агентами, а в случае кровотечения из артерии даже оказался эффективнее, чем Tachocomb. Столь низкая скорость действия материала Tachocomb может быть объяснена его составом, в который входит человеческий фибриноген и тромбин, в то время как испытания проводились на крысах. Также надо заметить, что инструкция к материалу Surgicel Nu-Knit не предусматривает его использование для остановки артериальных кровотечений, так что материалы на основе хитозана могут стать перспективной заменой в этом случае.

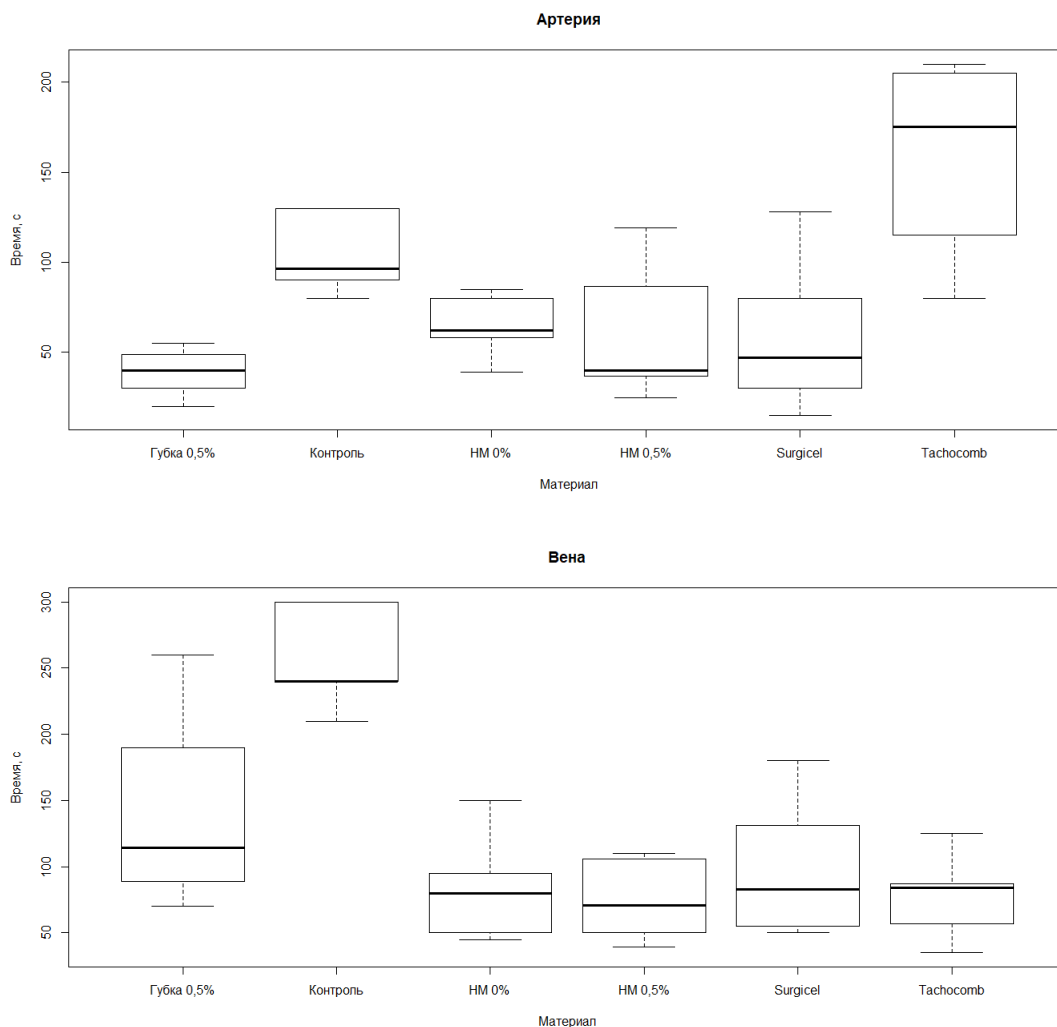


Рис. 3.20. Время остановки кровотечения различными материалами при артериальном и венозном кровотечении.

3.12. Имплантация гемостатических материалов

Спустя 14 суток после имплантации исследуемых гемостатических материалов были взяты биоптаты и проведено их гистологическое исследование. Микроскопическое исследование нетканого хитозанового материала (рис. 3.21) выявило наличие крупной макрофагальной гранулёмы, окружающей элементарные волокна нетканого материала (на фотографии окрашены красным цветом), в составе которой выявляются многочисленные гигантские многоядерные клетки типа инородных тел. Похожая ситуация наблюдается при исследовании нетканого материала с добавлением 0,5% НФХ (рис. 3.22): среди ярко окрашенных элементарных нитей материала отмечается форми-

рование крупной гранулёмы с многочисленными гигантскими клетками инородных тел, а также с мелкими очагами инфильтрации нейтрофильными лейкоцитами.

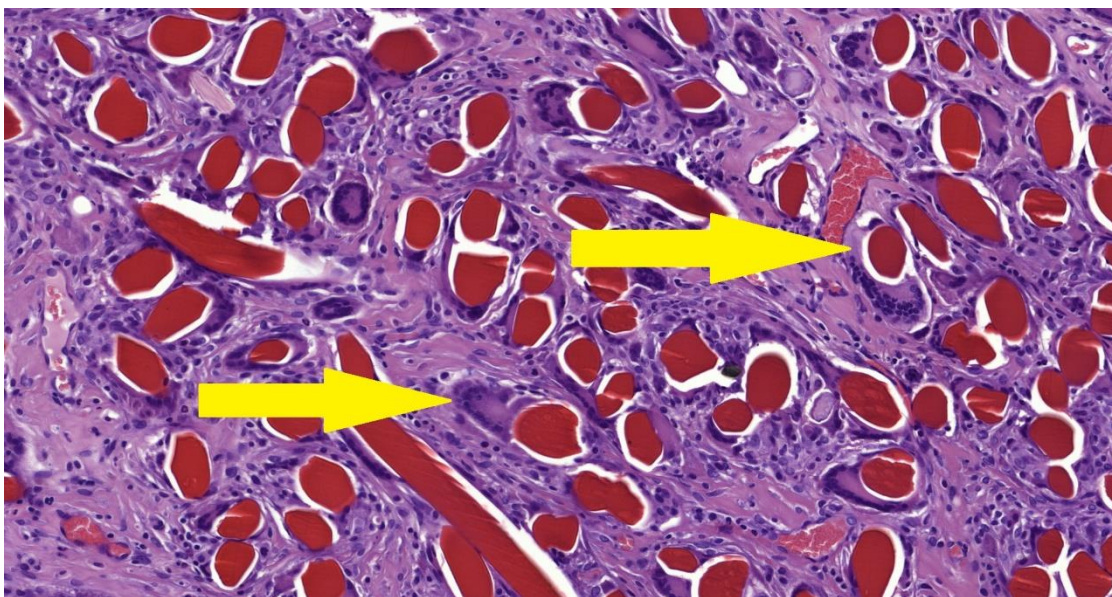


Рис. 3.21. Микрофотография гистологического исследования нетканого материала на основе хитозана, увеличение $\times 200$. Стрелками показаны гигантские многоядерные клетки в гранулёме.

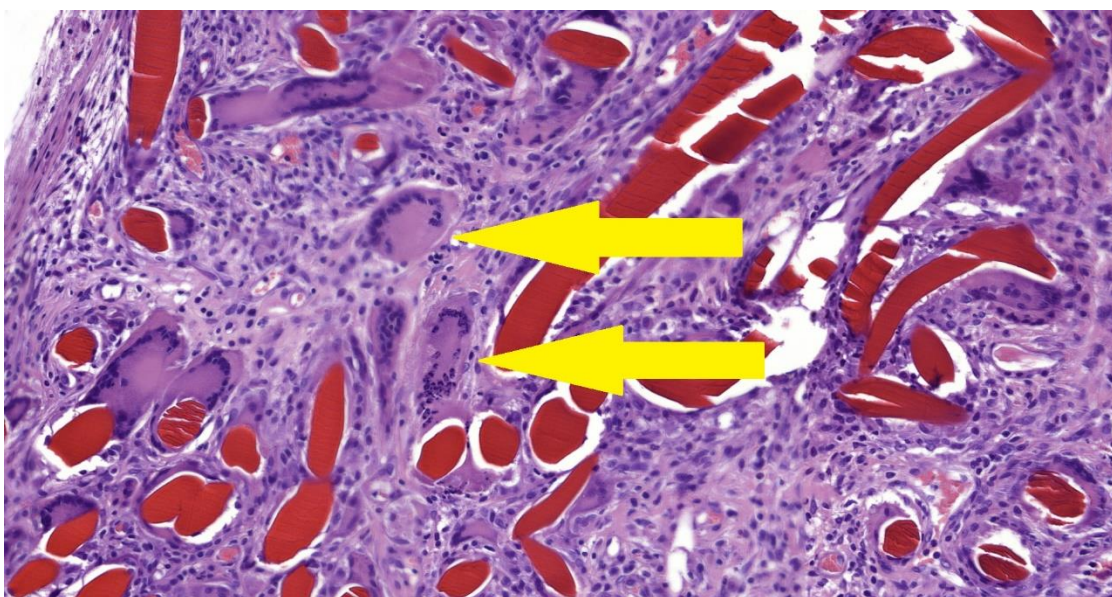


Рис. 3.22. Микрофотография гистологического исследования нетканого материала на основе хитозана с добавлением 0,5% НФХ, увеличение $\times 200$. Стрелками показаны гигантские многоядерные клетки в гранулёме.

Контрольная группа гемостатических материалов Surgicel Nu-Knit и Tachosorb отмечается быстрой биорезорбцией, на 14 сутки остались лишь небольшие следы их присутствия в организме (рис. 3.23). В случае обоих ма-

териалов наблюдается присутствие единичных гигантских многоядерных клеток типа инородных тел, а также лимфомакрофагальная инфильтрация, выраженная слабее у материала Surgicel. Также данный образец отличается небольшим очагом склероза, который выражен гораздо сильнее и представлен в виде грубоволокнистой соединительной ткани в случае использования материала Tachocomb.

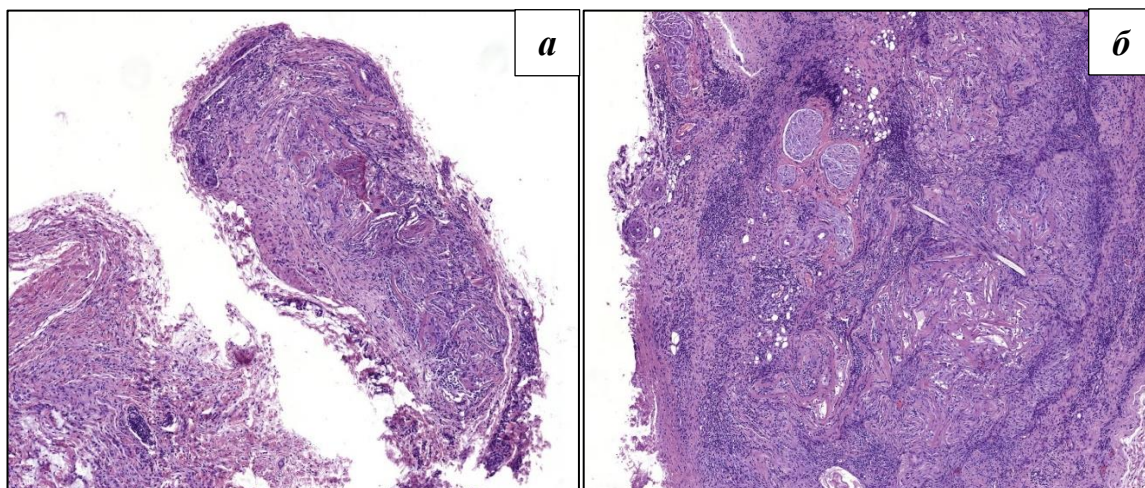


Рис. 3.23. Микрофотографии гистологического исследования материалов Surgicel (а) и Tachocomb (б), увеличение x50.

Таким образом, результаты гистологического исследования нетканых материалов демонстрируют сильные отличия в сравнении с контрольной группой с точки зрения тканевого ответа и резорбции материала. Кроме того, реакция прилежащих тканей отличается от таковой при самостоятельной имплантации элементарных волокон, из которых были изготовлены исследуемые материалы. Это может быть связано с крупной пористой структурой, которой обладают нетканые материалы, в связи с чем необходимо проведение дальнейших исследований.

ГЛАВА 4. ВЫВОДЫ

1. В ходе работы было проведено сравнение результатов диспергирования суспензии НФХ с использованием режимов с различными значениями мощности, частоты и времени воздействия. Было показано, что применение режима с максимальной силой воздействия (10 минут диспергирования при частоте 25 кГц и мощности 630 Вт) позволяет получить наименьший размер агрегатов, а также увеличить устойчивость диспергированной суспензии и получаемых на её основе растворов. В то же время, наилучшими механическими характеристиками обладали волокна, полученные при минимальной мощности диспергирования суспензии НФХ.

2. Введение НФХ в растворы хитозана оказало значительное влияние на физико-механические характеристики получаемых изделий. Так, использование малых концентраций НФХ способствовало упрочнению волокон, максимальные значения разрывного напряжения наблюдались при использовании концентрации НФХ 0,5%. При изучении влияния влажности среды на изменение механических свойств материалов, напротив, минимальным падением прочности обладали волокна с 50% содержанием НФХ. Данные результаты согласуются с экспериментом по изучению сорбционных способностей композиционных материалов, показавшего снижение сорбции паров воды при увеличении содержания НФХ. Измерение дзета-потенциала нетканых материалов на основе хитозана и с добавлением 0,5% НФХ показало наличие большего положительного заряда при значениях рН менее 8 у материала, содержащего НФХ.

3. Для предварительной оценки гемостатического потенциала материалов они были приведены в контакт с кровью *in vitro*. Максимальная адгезия тромбоцитов в первые пять минут контакта крови с композиционными волокнами наблюдалась при введении 0,5% НФХ. Аналогично, использование волокон с данной концентрацией сопровождалось наиболее выраженным

гемолизом. Эти данные и тот факт, что губки с добавкой 0,5% НФХ обладали максимальной сорбцией крови, позволяют предположить наличие наиболее выраженного гемостатического эффекта у материалов с данной концентрацией НФХ.

4. По результатам испытания гемостатических свойств композиционных губок при моделировании артериального кровотечения концентрация НФХ 0,5% была выбрана для изготовления нетканого материала. По времени остановки кровотечения данный материал оказался сравнимым с применяемыми в клинической практике гемостатиками Surgicel Nu-Knit и Tachocomb. Для исследования продолжительного взаимодействия с организмом была проведена имплантация волокон и изготовленных на их основе нетканых материалов. Несмотря на биоинертность элементарных волокон и формирование соединительнотканной капсулы вокруг них, удерживающей фрагментированные участки вместе, введение нетканых материалов сопровождалось сильным тканевым ответом, выраженным в виде макрофагальной гранулёмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения наиболее качественных композиционных растворов были проведены предварительные исследования по использованию различных режимов диспергирования суспензии НФХ. Результаты спектрофотометрических измерений показали, что использование режима с наибольшей мощностью и временем воздействия сопровождается наибольшей устойчивостью суспензии и изготавливаемых на её основе растворов в связи с наименьшим размером образующихся агрегатов, что было показано при микроскопическом исследовании композиционных плёнок. Для изучения влияния способа диспергирования на механические свойства получаемых изделий были получены волокна мокрым методом формования. Механические испытания этих волокон показали, что увеличение их прочностных характеристик наблюдается при использовании режима с минимальной мощностью воздействия, в связи с чем для дальнейших исследований материалы изготавливались из растворов с добавлением диспергированной в ультразвуковой ванне суспензии НФХ в течение 30 минут при частоте 35 кГц и мощности 130 Вт.

Испытания композиционных волокон продемонстрировали существенное влияние различных концентраций введённых в хитозан НФХ на их физико-механические свойства. Упрочнение волокон наблюдалось при использовании малых концентраций НФХ (до 5%), тогда как введение большого количества НФХ (до 50%) приводило к снижению разрывного напряжения волокон и деформации до разрыва. Наилучшие результаты продемонстрировали волокна с 0,5%-м содержанием НФХ. Это может быть связано с дополнительной ориентацией макромолекул хитозана вдоль нанофибрилл при их малом количестве, что приводит к упрочнению получаемых волокон. В то же время, использование больших концентраций НФХ приводит к образованию «хитиновой сетки», напротив, препятствующей образованию ориентированной структуры волокон.

С другой стороны, использование больших концентраций НФХ сопровождалось большей устойчивостью волокон к падению прочностных характеристик при увеличении влажности среды. Это может быть объяснено меньшими сорбционными способностями хитина в сравнении с хитозаном, что было показано в эксперименте по сорбции паров воды волокнами при их выдерживании в эксикаторах с различным относительным давлением.

Введение НФХ в растворы хитозана влияет не только на физико-механические, но и на биологические свойства получаемых материалов. При контакте крови с композиционными волокнами *in vitro* максимальная адгезия тромбоцитов наблюдалась при использовании концентрации НФХ 0,5%. Аналогично, взаимодействие плазмы крови с материалом с 0,5% содержанием НФХ приводило к увеличению её оптической плотности, что свидетельствует о наличии гемолитических процессов. Кроме того, композиционные губки с данной концентрацией НФХ показали максимальное значение впитываемости крови. Таким образом, было сделано предположение, что материалы на основе хитозана с 0,5% добавкой НФХ обладают наибольшим гемостатическим потенциалом.

Для оценки кровеостанавливающих свойств материалов и их взаимодействия с организмом были проведены испытания *in vivo*. Было измерено время остановки артериального кровотечения при использовании различных концентраций НФХ. В соответствии с результатами предшествующих испытаний *in vitro*, наиболее выраженным гемостатическим эффектом обладали губки с 0,5% содержанием НФХ, ввиду чего данная концентрация была использована для изготовления нетканого материала, который оказался сравнимым с коммерческими кровеостанавливающими препаратами Surgicel Nu-Knit и Tachosorb при моделировании артериального и венозного кровотечений. Измерение дзета-потенциала нетканых материалов с добавлением 0,5% НФХ и без их добавки показало наличие большего положительного заряда при кислотности среды менее 8 в случае использования композиционного материала, что, опять же, свидетельствует о его большем гемостатическом

потенциале ввиду возможности лучшего взаимодействия с отрицательно заряженными клетками крови.

Для оценки эффектов долгосрочного взаимодействия с организмом материалов с различным содержанием НФХ была проведена имплантация волокон субфасциально и внутримышечно в *m. latissimus dorsi*. Обе группы продемонстрировали биоинертный характер и отсутствие воспалительной реакции вне зависимости от содержания НФХ. Образование соединительнотканной капсулы к 91 суткам имплантации приводило к удерживанию фрагментированных участков волокон вместе, препятствуя их рассасыванию в организме. Однако использование нетканых материалов, изготовленных на основе данных волокон, сопровождалось иным тканевым ответом: на 14 сутки введения наблюдалась гранулематозная реакция с присутствием гигантских многоядерных клеток типа инородных тел.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гавронская Ю.Ю. Коллоидная химия: учебник и практикум для академического бакалавриата / Ю.Ю. Гавронская, под ред. В.Н. Пак, Ю.Ю. Гавронской, Москва: Издательство Юрайт, 2019. 287 с.
2. Гребенников С.Ф., Кынин А.Т. Сорбционные свойства химических волокон и полимеров // Журнал прикладной химии. 1982. № 10 (55). С. 2053–2058.
3. Гребенников С.Ф., Эльтеков Ю.А. Сорбция в полимерных системах / С.Ф. Гребенников, Ю.А. Эльтеков, ФГБОУВПО «СПГУТД»-е изд., СПб., 2014. 282 с.
4. Грицюк О.Й., Амосова К.М. Практическая гемостазиология / Грицюк О.Й., Амосова К.М., 1994. 256 с.
5. Добровольская И.П. Полимерные матрицы для тканевой инженерии / И.П. Добровольская, В.Е. Юдин, П.В. Попрядухин, Е.М. Иванькова, СПб: Издательско-полиграфическая ассоциация университетов России, 2016. 224 с.
6. Дресвянина Е.Н., Гребенников С.Ф., Добровольская И.П., Масленникова Т.П., Иванькова Е.М., Юдин В.Е. Влияние наночастиц хитина на сорбционные свойства композиционных пленок на основе хитозана // Высокомолекулярные соединения А. 2020. № 3 (62). С. 181–188.
7. Кутафина Н.В., Завалишина С.Ю. Механизмы функционирования сосудистоотромбоцитарного гемостаза // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2012. С. 30–37.
8. Луцевич О.Э., Гринь А.А., Бичев А.А., Шепелев В.В. Особенности применения гемостатических материалов местного действия в хирургии // Московский хирургический журнал. 2016. (3). С. 12–20.
9. Маевская Е.Н., Дресвянина Е.Н. Нетканый гемостатический материал на основе хитозана // Материалы научной конференции с международным

участием «Неделя науки СПбПУ. Институт биомедицинских систем и технологий». 2018. С. 133–136.

10. Маевская Е.Н., Дресвянина Е.Н. Получение нетканого гемостатического материала на основе волокон из хитозана // Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы. Иваново: ИВГПУ. 2018. С. 6–11.

11. Маевская Е.Н., Юденко А.Н., Дресвянина Е.Н., Юдин В.Е. Получение и свойства монофиламентных нитей из хитозана // Материалы научной конференции с международным участием XLV «Неделя науки СПбПУ. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций». 2016. С. 469–471.

12. Маевская Е.Н., Юденко А.Н., Дресвянина Е.Н., Юдин В.Е. Механические свойства нитей из хитозана, полученных при различных условиях формирования // тезисы докладов на второй российской конференции с международным участием “Физика - наукам о жизни.” 2017. С. 108.

13. Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Тромбоциты и гемостаз // Онкогематология. 2014. (2). С. 65–73.

14. Покровский В.М. Физиология человека / В.М. Покровский, под ред. В.М. Покровского, Г.Ф. Коротько, Москва: Медицина, 2011. 664 с.

15. Achneck H.E., Sileshi B., Jamiolkowski R.M., Albala D.M., Shapiro M.L., Lawson J.H. A Comprehensive Review of Topical Hemostatic Agents // *Annals of Surgery*. 2010. № 2 (251). С. 217–228.

16. Alam H.B., Burriss D., DaCorta J.A., Rhee P. Hemorrhage Control in the Battlefield: Role of New Hemostatic Agents // *Military Medicine*. 2005. № 1 (170). С. 63–69.

17. Alizadeh F., Fakoor A., Haghdani S. A comparison between tourniquet application and epinephrine injection for hemostasis during hypospadias surgery: The effect on bleeding and postoperative outcome // *Journal of Pediatric Urology*. 2016. № 3 (12). С. 160.e1-160.e5.

18. Andreoli T.E., Bennett J.C., Carpenter C.C.J. Platelets and primary hemostasis / T.E. Andreoli, J.C. Bennett, C.C.J. Carpenter, CecilEssentialsofMed-e изд., Philadelphia: WB Saunders, 1997. 403 с.
19. Antisdell J. Hemostatic Agent Microporous Polysaccharide Hemospheres (MPH) Does Not Affect Healing or Intact Sinus Mucosa // *The Laryngoscope*. 2008. № 7 (118). С. 1265–1269.
20. Aranaz I., Acosta N., Civera C., Elorza B., Mingo J., Castro C., Gandía M., Heras Caballero A. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives // *Polymers*. 2018. № 2 (10). С. 213.
21. Bai M.-Y., Chou T.-C., Tsai J.-C., Yang H.-C. Active ingredient-containing chitosan/polycaprolactone nonwoven mats: Characterizations and their functional assays // *Materials Science and Engineering: C*. 2013. № 1 (33). С. 224–233.
22. Baird S.M., Teh B.M., Lim K.K.M., Campbell M.C. Bone wax extrusion through postauricular wounds: A case series // *The Laryngoscope*. 2018. № 2 (128). С. 369–372.
23. Boarin Alcalde L., Graciano Fonseca G. Alkali process for chitin extraction and chitosan production from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales // *Latin American Journal of Aquatic Research*. 2016. № 4 (44). С. 683–688.
24. Boucard N., Viton C., Agay D., Mari E., Roger T., Chancerelle Y., Domard A. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns // *Biomaterials*. 2007. № 24 (28). С. 3478–3488.
25. Chen Y., Zhang Y., Wang F., Meng W., Yang X., Li P., Jiang J., Tan H., Zheng Y. Preparation of porous carboxymethyl chitosan grafted poly (acrylic acid) superabsorbent by solvent precipitation and its application as a hemostatic wound dressing // *Materials Science and Engineering: C*. 2016. (63). С. 18–29.
26. Dai N.T., Fu K.Y., Hsieh P.S., Hung Y.M., Fang Y.L., Huang N.C., Lu T.W., Dai L.G., Chen S.G., Chen T.M. A biodegradable hemostatic gelatin/polycaprolactone composite for surgical hemostasis // *Annals of Plastic Surgery*. 2017. № 3 (78). С. S124–S128.

27. Das J.M. Bone Wax in Neurosurgery: A Review // *World Neurosurgery*. 2018. (116). C. 72–76.
28. Dodane V., Vilivalam V.D. Pharmaceutical applications of chitosan // *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1998. № 6 (1). C. 246–253.
29. Dresvyanina E., Yudenko A., Yevlampieva N., Maevskaya E., Yudin V., Gubarev A., Slyusarenko M., Heppe K. The Molecular Mass Effect On Mechanical Properties Of Chitosan Fibers // *Vlakna a Textil*. 2018. № 2 (25). C. 27–31.
30. Dresvyanina E.N., Dobrovol'skaya I.P., Popryadukhin P. v., Yudin V.E., Ivan'kova E.M., Elokhovskii V.Yu., Khomenko A.Yu. Influence of spinning conditions on properties of chitosan fibers // *Fibre Chemistry*. 2013. № 5 (44). C. 280–283.
31. East G.C., Qin Y. Wet spinning of chitosan and the acetylation of chitosan fibers // *Journal of Applied Polymer Science*. 1993. № 10 (50). C. 1773–1779.
32. Ersoy G., Kaynak M.F., Yilmaz O., Rodoplu U., Maltepe F., Gokmen N. Hemostatic effects of Microporous Polysaccharide Hemosphere® in a rat model with severe femoral artery bleeding // *Advances in Therapy*. 2007. № 3 (24). C. 485–492.
33. Fahradyan A., Ohanisian L., Tsuha M., Park M.J., Hammoudeh J.A. An Unusual Complication of Bone Wax Utilization // *Journal of Craniofacial Surgery*. 2018. № 4 (29). C. 976–979.
34. Fan L., Yang H., Yang J., Peng M., Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings // *Carbohydrate Polymers*. 2016. (146). C. 427–434.
35. Finn M.D., Schow S.R., Schneiderman E.D. Osseous regeneration in the presence of four common hemostatic agents // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1992. № 6 (50). C. 608–612.
36. Freier T., Koh H.S., Kazazian K., Shoichet M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation // *Biomaterials*. 2005. № 29 (26). C. 5872–5878.

37. Gazzeri R., Galarza M., Morabito M., Alfieri A. Clinical Use and Hemostatic Application of Gelatin 2018. 53–96 c.
38. Ghassemi K.A., Jensen D.M. Evolving techniques for gastrointestinal endoscopic hemostasis treatment // *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2016. № 5 (10). C. 615–623.
39. Göbel K., Eichler S., Wiendl H., Chavakis T., Kleinschnitz C., Meuth S.G. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders—A Systematic Review // *Frontiers in Immunology*. 2018. (9).
40. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity // *Carbohydrate Polymers*. 2008. № 4 (71). C. 694–697.
41. Hattori H., Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan // *Biomedical Materials*. 2015. № 1 (10). C. 015014.
42. Heidari F., Razavi M., Bahrololoom M.E., Tahriri M., Rasoulianboroujeni M., Koturi H., Tayebi L. Preparation of natural chitosan from shrimp shell with different deacetylation degree // *Materials Research Innovations*. 2018. № 3 (22). C. 177–181.
43. Hickman D.A., Pawlowski C.L., Sekhon U.D.S., Marks J., Gupta A. sen Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding // *Advanced Materials*. 2018. № 4 (30). C. 1700859.
44. Hossain K.M.Z., Patel U., Ahmed I. Development of microspheres for biomedical applications: a review // *Progress in Biomaterials*. 2015. № 1 (4). C. 1–19.
45. Howe N., Cherpelis B. Obtaining rapid and effective hemostasis // *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013. № 5 (69). C. 659.e1-659.e17.
46. Hu Z., Zhang D.-Y., Lu S.-T., Li P.-W., Li S.-D. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications // *Marine Drugs*. 2018. № 8 (16). C. 273.

47. Huang X., Jia J., Wang Z., Hu Q. A novel chitosan-based sponge coated with self-assembled thrombin/tannic acid multilayer films as a hemostatic dressing // *Chinese Journal of Polymer Science*. 2015. № 2 (33). C. 284–290.

48. Huang Y., Feng L., Zhang Y., He L., Wang C., Xu J., Wu J., Kirk T.B., Guo R., Xue W. Hemostasis mechanism and applications of N-alkylated chitosan sponge // *Polymers for Advanced Technologies*. 2017. № 9 (28). C. 1107–1114.

49. Jenkins H.P. Present status of gelatin sponge for the control of hemorrhage // *Journal of the American Medical Association*. 1946. № 11 (132). C. 614.

50. Jensen D.M., Machicado G.A. Endoscopic Hemostasis of Ulcer Hemorrhage with Injection, Thermal, and Combination Methods // *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*. 2005. № 3 (7). C. 124–131.

51. Johnson D., Bates S., Nukalo S., Staub A., Hines A., Leishman T., Michel J., Sikes D., Gegel B., Burgert J. The effects of QuikClot Combat Gauze on hemorrhage control in the presence of hemodilution and hypothermia // *Annals of Medicine and Surgery*. 2014. № 2 (3). C. 21–25.

52. Karahaliloğlu Z., Demirbilek M., Ulusoy İ., Gümüşkaya B., Denkbaş E.B. Active nano/microlayer hemostatic agents for diabetic rat bleeding model // *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2017. № 6 (105). C. 1573–1585.

53. Kichler A., Jang S. Endoscopic Hemostasis for Non-Variceal Upper Gastrointestinal Bleeding: New Frontiers // *Clinical Endoscopy*. 2019. № 5 (52). C. 401–406.

54. Kim I.-Y., Seo S.-J., Moon H.-S., Yoo M.-K., Park I.-Y., Kim B.-C., Cho C.-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications // *Biotechnology Advances*. 2008. № 1 (26). C. 1–21.

55. Kirichuk O.P., Maevskaya E.N., Burkova N.V., Dresvyanina E.N., Kuznetsov S.I., Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E. Comparative Characteristics Of The Reaction Of The Cellular Elements Of Venous Blood In Contact With The Carbon Hemosorbent And Fiber Of Chitosan In Vitro // *Tsitologiya*. 2019. № 11 (61). C. 864–871.

56. Larson P.O. Review: Topical Hemostatic Agents for Dermatologic Surgery // *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*. 1988. № 6 (14). С. 623–632.
57. Lee S., Pham A.M., Pryor S.G., Tollefson T., Sykes J.M. Efficacy of Crosseal Fibrin Sealant (Human) in Rhytidectomy // *Archives of Facial Plastic Surgery*. 2009. № 1 (11).
58. Lewis K.M., Atlee H., Mannone A., Lin L., Goppelt A. Efficacy of hemostatic matrix and microporous polysaccharide hemospheres // *Journal of Surgical Research*. 2015. № 2 (193). С. 825–830.
59. Li L., Du Y., Yin Z., Li L., Peng H., Zheng H., Yang A., Li H., Lv G. Preparation and the hemostatic property study of porous gelatin microspheres both in vitro and in vivo // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020. (187).
60. Li Q., Lu F., Zhou G., Yu K., Lu B., Xiao Y., Dai F., Wu D., Lan G. Silver Inlaid with Gold Nanoparticle/Chitosan Wound Dressing Enhances Antibacterial Activity and Porosity, and Promotes Wound Healing // *Biomacromolecules*. 2017. № 11 (18). С. 3766–3775.
61. Lipatov V.A., Lazarenko S. v., Sotnikov K.A., Severinov D.A., Ershov M.P. To the issue of methodology of comparative study of the degree of hemostatic activity of topical hemostatic agents // *Novosti Khirurgii*. 2018. Т. 26. № 1. 81–95 с.
62. Liu J.Y., Li Y., Hu Y., Cheng G., Ye E., Shen C., Xu F.J. Hemostatic porous sponges of cross-linked hyaluronic acid/cationized dextran by one self-foaming process // *Materials Science and Engineering C*. 2018. (83). С. 160–168.
63. Liu W., Xi G., Yang X., Hao X., Wang M., Feng Y., Chen H., Shi C. Poly(lactide-: Co -glycolide) grafted hyaluronic acid-based electrospun fibrous hemostatic fragments as a sustainable anti-infection and immunoregulation material // *Journal of Materials Chemistry B*. 2019. № 32 (7). С. 4997–5010.
64. Lo C.-C., Hsu P.-I., Lo G.-H., Lin C.-K., Chan H.-H., Tsai W.-L., Chen W.-C., Wu C.-J., Yu H.-C., Cheng J.-S., Lai K.-H. Comparison of hemostatic efficacy for epinephrine injection alone and injection combined with hemoclip therapy

in treating high-risk bleeding ulcers // *Gastrointestinal Endoscopy*. 2006. № 6 (63). C. 767–773.

65. Logun M.T., Dowling M.B., Raghavan S.R., Wallace M.L., Schmiedt C., Stice S., Karumbaiah L. Expanding Hydrophobically Modified Chitosan Foam for Internal Surgical Hemostasis: Safety Evaluation in a Murine Model // *Journal of Surgical Research*. 2019. (239). C. 269–277.

66. Ma Y., Xin L., Tan H., Fan M., Li J., Jia Y., Ling Z., Chen Y., Hu X. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing // *Materials Science and Engineering: C*. 2017. (81). C. 522–531.

67. Maevskaia E., Dresvyanina E., Yudin V. The study of mechanical and biological properties of the chitosan-chitin composite fibers // *6th International Polysaccharide Conference EPNOE*. 2019. C. 316.

68. Maevskaia E., Kirichuk O., Kuznetsov S., Dresvyanina E., Yudin V., Morganti P. Hemocompatible chitin-chitosan composite fibers // *Cosmetics*. 2020. № 28 (7).

69. Maevskaia E., Dresvyanina E., Yudenko A., Yudin V. The improvement of wet spinning of chitosan fibers // *3rd International EPNOE Junior Scientists Meeting*. 2018. C. 86.

70. Markushin S.G., Akopova I.I., Blagodatskikh I. v., Kulikov S.N., Bezrodnikh E.A., Muranov A. v., Yamskov I.A., Tikhonov V.E. Effect of Molecular Weight and Degree of Acetylation on Adjuvantive Properties of Chitosan Derivatives // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. № 5 (54). C. 512–517.

71. McManus J., Hurtado T., Pusateri A., Knoop K.J. A case Series Describing Thermal Injury Resulting From Zeolite Use for Hemorrhage Control in Combat Operations // *Prehospital Emergency Care*. 2007. № 1 (11). C. 67–71.

72. Murat F.-J.L., Ereth M.H., Dong Y., Piedra M.P., Gettman M.T. Evaluation of microporous polysaccharide hemospheres as a novel hemostatic agent in open partial nephrectomy: favorable experimental results in the porcine model // *Journal of Urology*. 2004. № 3 (172). C. 1119–1122.

73. No H. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights // *International Journal of Food Microbiology*. 2002. № 1–2 (74). C. 65–72.
74. Palm M.D., Altman J.S. Topical Hemostatic Agents: A Review // *Dermatologic Surgery*. 2008. № 4 (34). C. 431–445.
75. Pan M., Tang Z., Tu J., Wang Z., Chen Q., Xiao R., Liu H. Porous chitosan microspheres containing zinc ion for enhanced thrombosis and hemostasis // *Materials Science and Engineering C*. 2018. (85). C. 27–36.
76. Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // *Progress in Polymer Science*. 2009. № 7 (34). C. 641–678.
77. Pogorielov M. v., Sikora V.Z. Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State // *European Journal of Medicine. Series B*. 2015. № 1 (2). C. 24–33.
78. Qin Y. The preparation and characterization of chitosan wound dressings with different degrees of acetylation // *Journal of Applied Polymer Science*. 2008. № 2 (107). C. 993–999.
79. Ravi Kumar M.N.V. A review of chitin and chitosan applications // *Reactive and Functional Polymers*. 2000. № 1 (46). C. 1–27.
80. Ren D., Yi H., Wang W., Ma X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation // *Carbohydrate Research*. 2005. № 15 (340). C. 2403–2410.
81. Samudrala S. Topical Hemostatic Agents in Surgery: A Surgeon's Perspective // *AORN Journal*. 2008. № 3 (88). C. S2–S11.
82. Sanad R.A.-B., Abdel-Bar H.M. Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing // *Carbohydrate Polymers*. 2017. (173). C. 441–450.
83. Seo Y.B., Lee O.J., Sultan M.T., Lee J.M., Park Y.R., Yeon Y.K., Lee J.S., Lee Y.J., Kim S.H., Park C.H. In vitro and in vivo evaluation of the duck's feet collagen sponge for hemostatic applications // *Journal of Biomaterials Applications*. 2017. № 4 (32). C. 484–491.

84. Shi X., Fang Q., Ding M., Wu J., Ye F., Lv Z., Jin J. Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study // *Journal of Biomaterials Applications*. 2016. № 7 (30). C. 1092–1102.

85. Siemer S., Lahme S., Altziebler S., Machtens S., Strohmaier W., Wechsel H.-W., Goebell P., Schmeller N., Oberneder R., Stolzenburg J.-U., Becker H., Lüftenegger W., Tetens V., Poppel H. van Efficacy and Safety of TachoSil® as Haemostatic Treatment versus Standard Suturing in Kidney Tumour Resection: A Randomised Prospective Study // *European Urology*. 2007. № 4 (52). C. 1156–1163.

86. Simak J., Paoli S. de The effects of nanomaterials on blood coagulation in hemostasis and thrombosis // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017. T. 9. № 5.

87. Sinauridze E.I., Vuimo T.A., Tarandovskiy I.D., Ovsepyan R.A., Surov S.S., Korotina N.G., Serebriyskiy I.I., Lutsenko M.M., Sokolov A.L., Ataulakhanov F.I. Thrombodynamics, a new global coagulation test: Measurement of heparin efficiency // *Talanta*. 2018. (180). C. 282–291.

88. Smirnova N. v., Kolbe K.A., Dresvyanina E.N., Grebennikov S.F., Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Luxbacher T., Morganti P. Effect of Chitin Nanofibrils on Biocompatibility and Bioactivity of the Chitosan-Based Composite Film Matrix Intended for Tissue Engineering // *Materials*. 2019. № 11 (12). C. 1874.

89. Smotrina T.V., Dresvyanina E.N., Grebennikov S.F., Kazakov M.O., Maslennikova T.P., Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E. Interaction between water and the composite materials based on chitosan and chitin nanofibrils // *Polymer*. 2020. (189). C. 1221–66.

90. Sun X., Tang Z., Pan M., Wang Z., Yang H., Liu H. Chitosan/kaolin composite porous microspheres with high hemostatic efficacy // *Carbohydrate Polymers*. 2017. (177). C. 135–143.

91. T. Peng H. Comparative Study of Hemostatic Agents Using Thrombelastography // *Material Science and Engineering with Advanced Research*. 2016. № 4 (1). C. 1–7.

92. Tanpichai S., Witayakran S., Wootthikanokkhan J., Srimarut Y., Woraprayote W., Malila Y. Mechanical and antibacterial properties of the chitosan coated cellulose paper for packaging applications: Effects of molecular weight types and concentrations of chitosan // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019.
93. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review // *Journal of Artificial Organs*. 2005. № 3 (8). C. 137–142.
94. Ueno H., Mori T., Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. № 2 (52). C. 105–115.
95. Vadasz Z., Toubi E. Hemostasis in Allergy // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2018. № 07 (44). C. 669–675.
96. Vårum K.M., Myhr M.M., Hjerde R.J.N., Smidsrød O. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum // *Carbohydrate Research*. 1997. № 1–2 (299). C. 99–101.
97. Vedakumari W.S., Ayaz N., Karthick A.S., Senthil R., Sastry T.P. Quercetin impregnated chitosan–fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials — Fabrication, characterization and in vivo analysis // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. (97). C. 106–112.
98. Verma A., Nagarwal R.C., Sharma S.D., Pandit J.K. Preparation and characterization of floating gellan-chitosan polyelectrolyte complex beads // *Latin American Journal of Pharmacy*. 2012. № 1 (31). C. 138–146.
99. Wang F.M., Wei C.P., Li J., Sun S., Dong L.D., Liu Q.Y. Preparation and Performance Characterization of Hemostatic Materials // *Materials Science Forum*. 2016. (852). C. 1282–1287.
100. Watanabe N., Nogawa M., Ishiguro M., Maruyama H., Shiba M., Satake M., Eto K., Handa M. Refined methods to evaluate the in vivo hemostatic function and viability of transfused human platelets in rabbit models // *Transfusion*. 2017. № 8 (57). C. 2035–2044.

101. Wei S., Chen F., Geng Z., Cui R., Zhao Y., Liu C. Self-assembling RA-TEA16 peptide nanofiber designed for rapid hemostasis // *Journal of Materials Chemistry B*. 2020. № 9 (8). C. 1897–1905.
102. Wiegand C., Abel M., Hipler U.C., Elsner P., Zieger M., Kurz J., Wendel H.P., Stoppelkamp S. Hemostatic wound dressings: Predicting their effects by in vitro tests // *Journal of Biomaterials Applications*. 2019. № 9 (33). C. 1285–1297.
103. Wu C.-C., Ko F.-N., Huang T.-F., Teng C.-M. Mechanisms-Regulated Platelet Spreading after Initial Platelet Contact with Collagen // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. № 2 (220). C. 388–393.
104. Yang J., Tian F., Wang Z., Wang Q., Zeng Y.-J., Chen S.-Q. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2008. № 1 (84B). C. 131–137.
105. Yudin V.E., Dobrovolskaya I.P., Neelov I.M., Dresvyanina E.N., Popryadukhin P. V., Ivan'kova E.M., Elokhovskii V.Yu., Kasatkin I.A., Okrugin B.M., Morganti P. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils // *Carbohydrate Polymers*. 2014. (108). C. 176–182.
106. Zhang J., Xue S., Zhu X., Zhao Y., Chen Y., Tong J., Shi X., Du Y., Zhong Z., Ye Q. Emerging chitin nanogels/rectorite nanocomposites for safe and effective hemorrhage control // *Journal of Materials Chemistry B*. 2019. № 33 (7). C. 5096–5103.
107. Zhou H., Ge J., Bai Y., Liang C., Yang L. Translation of bone wax and its substitutes: History, clinical status and future directions // *Journal of Orthopaedic Translation*. 2019. (17). C. 64–72.
108. Zhou X., Wang H., Zhang J., Li X., Wu Y., Wei Y., Ji S., Kong D., Zhao Q. Functional poly(ϵ -caprolactone)/chitosan dressings with nitric oxide-releasing property improve wound healing // *Acta Biomaterialia*. 2017. (54). C. 128–137.