

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование

Профили подготовки Биология. Химия

Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

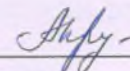
**«ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ
КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛОВ»**

Студент



Стародубова Наталья Михайловна

Руководитель



Кручинина А. Д.

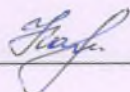
Нормоконтролер



Клыченков С. В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 04.06.25 № 13a)

Заведующий кафедрой



Карпова Г. А.

Работа защищена с отметкой

отлично

(протокол заседания ГЭК от 09.07.25 № 13)

Секретарь ГЭК



Клыченков С. В.

Пенза, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Механизм гемостаза <i>in vivo</i>	6
1.2 Современные гемостатические средства	8
1.3 Коллаген как биоматериал	14
1.4 Имплантат-ассоциированные инфекции	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
2.1 УФ-спектрофотометрия как метод количественного анализа лекарственных средств.....	22
2.1.1 Метод количественного определения аминокaproновой кислоты	23
2.1.2 Метод количественного определения ванкомицина.....	23
2.1.3 Метод количественного определения ципрофлоксацина	24
2.2 Оценка сорбционной ёмкости коллагеновой матрицы	25
2.3 Исследование кинетики высвобождения лекарств из гемостатического изделия в условиях <i>in vitro</i>	25
2.4 Изучение скорости резорбции биоматериала в условиях <i>in vitro</i>	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1 Результаты спектрофотометрического определения аминокaproновой кислоты	27
3.2 Результаты спектрофотометрического определения ванкомицина	31
3.3 Результаты спектрофотометрического определения ципрофлоксацина	33
3.4 Результаты изучения сорбционных свойств коллагеновой матрицы ..	35

3.5 Результаты кинетики высвобождения лекарств гемостатического изделия в условиях <i>in vitro</i>	36
3.6 Результаты исследования устойчивости биоматериала к окислительному стрессу в условиях <i>in vitro</i>	39
3.7 Методические рекомендации для школьного проекта по теме «Исследование свойств коллагеновой 3D-матрицы, модифицированной антибиотиками и аминкапроновой кислотой»	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Неконтролируемое кровотечение из раны (при дорожно-транспортных происшествиях, несчастных случаях на производстве, при боевых действиях) и хирургическое кровотечение являются основными причинами смерти. Чрезмерное кровотечение увеличивает продолжительность операции и повышает риск повторного хирургического вмешательства [24, 28]. В жизни гражданского общества доля первичных причин летальных исходов при травмах, связанных с неконтролируемым кровотечением, составляет около 80%. При этом за последние 150 лет половина причин смерти солдат на поле боя связана с кровопотерей [52]. Для предотвращения быстрой кровопотери ключевую роль могут играть гемостатические препараты [36].

Традиционные кровоостанавливающие средства, такие как перевязка, жгут и марля под давлением, в основном полагаются на физическое препятствие и систему самокоагуляции. Однако данные методы имеют множество недостатков, таких как неудобство применения, короткий срок действия, и неудовлетворительный эффект гемостаза (возникновение вторичных травм, риск инфекции). Хотя хирургические меры могут временно остановить кровотечение, гемостатические средства все еще необходимы для вспомогательного лечения [24, 50].

Исследование и разработка гемостатических методов и препаратов, особенно местных гемостатиков, в настоящее время ведется либо путем поиска новых материалов, либо путем модификации для улучшения существующих материалов.

За последние несколько десятилетий были разработаны различные кровоостанавливающие повязки с разным уровнем эффективности, но ни одна из них не считается идеальной. Гемостатическая повязка должна обеспечивать влажную среду в ране, поглощать избыток раневого экссудата, обеспечивать

быструю и устойчивую эффективность гемостаза, быть не цитотоксичной и воздухопроницаемой, а также предотвращать бактериальную инвазию [50].

Именно таким средством для остановки локальных кровотечений являются коллагеновые губки, которые представляют собой пористые пластины толщиной 5-9 мм. Микроструктура коллагена может быть использована для загрузки лекарственных препаратов для достижения более быстрого гемостатического эффекта [6].

Системный гемостаз может быть достигнут с помощью использования аминокaproновой кислоты, которая является ингибитором фибринолиза [19]. В связи с высоким риском инфицирования при внедрении гемостатического изделия в организм важно придать губкам антибактериальную активность [35].

Цель работы: изучить свойства гемостатического коллагенсодержащего материала, модифицированного антибактериальными препаратами.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

- 1) адаптировать фотометрический метод количественного определения аминокaproновой кислоты к условиям исследования;
- 2) провести анализ УФ-спектров антибиотиков, выбрать характеристические длины волн для количественного определения;
- 3) оценить сорбционные свойства и кинетику высвобождения лекарственных веществ из коллагеновой матрицы в условиях *in vitro*;
- 4) провести моделирование скорости резорбции биоматериала в условиях *in vitro*;
- 5) разработать и представить методические рекомендации для школьного учебного проекта на основе выполненного исследования.

Выпускная квалификационная работа написана на 52 листах, содержит 11 рисунков, 7 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 52 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Механизм гемостаза *in vivo*

Гемостаз – это многоступенчатый процесс, который останавливает кровотечение и в то же время – система поддержания жидкого состояния крови [12]. Механизм гемостаза *in vivo* включает три взаимосвязанных процесса: сосудисто-тромбоцитарный (первичный) гемостаз, коагуляционный (вторичный) гемостаз и фибринолиз.

Первичный гемостаз начинается сразу после повреждения сосуда. Сначала происходит вазоконстрикция – сужение кровеносных сосудов в ответ на повреждение, что уменьшает кровопотерю. В результате травмы также нарушается целостность эндотелиального слоя сосудистой стенки, обнажается субэндотелиальный матрикс, содержащий коллаген и фактор фон Виллебранда. Это приводит к адгезии и активации тромбоцитов. Активированные тромбоциты изменяют форму, выделяют медиаторы (аденозиндифосфат, серотонин, тромбоксан A₂), что усиливает агрегацию тромбоцитов и формирует первичную тромбоцитарную пробку в месте повреждения. Данный процесс локализован, что предотвращает возникновение осложнений, таких как тромбоэмболия [16, 29].

Тромбоциты играют ключевую роль не только в формировании первичного тромба, но и в регуляции сосудистого тонуса, высвобождая вазоактивные вещества. Этот процесс обеспечивает локальную регуляцию кровообращения и способствует минимизации повреждений в окружающих тканях.

Вторичный гемостаз включает активацию каскада свертывания крови и стабилизацию образовавшейся тромбоцитарной пробки. Центральную роль играет тканевой фактор, экспрессируемый повреждёнными тканями, который при контакте с кровью активирует фактор VII. Комплекс тканевого фактора и активированного фактора VII (VIIa) запускает внешний путь коагуляции,

приводя к активации факторов X и IX. Фактор Ха, образующийся в достаточном количестве, превращает протромбин в тромбин. Тромбин в свою очередь переводит растворимый фибриноген в нерастворимый фибрин, формируя фибриновую сеть, которая укрепляет тромб. Тромбин также активирует фактор XIII, который стабилизирует фибриновую сеть за счёт ковалентного сшивания фибриновых нитей [16, 41].

Вторичный гемостаз протекает по двум путям – внешнему (тканевой фактор) и внутреннему (контактному). Внешний путь активируется при повреждении тканей, внутренний – при контакте фактора XII с отрицательно заряженными поверхностями. Эти пути сходятся на общем пути, где фактор X активируется до Ха, что и приводит к образованию тромбина [49]. Важно отметить, что оба пути коагуляции взаимодействуют между собой и имеют общие регуляторные механизмы, обеспечивающие точность и эффективность свёртывания крови. Нарушение баланса между этими путями может привести к патологическим состояниям, таким как тромбоз или кровотечения.

Фибринолиз является заключительным этапом гемостаза. После заживления сосуда происходит активация плазминогена до плазмина, который разрушает фибрин, растворяя тромб и восстанавливая нормальный кровоток. Фибринолиз предотвращает чрезмерное образование тромбов и способствует нормальному восстановлению ткани после травмы [23]. Регуляция фибринолиза осуществляется с помощью ингибиторов плазмина, таких как α_2 -антиплазмин, которые обеспечивают контролируемый распад сгустка и предотвращают преждевременное или чрезмерное растворение тромба.

Система гемостаза поддерживает тонкий баланс между прокоагулянтными и антикоагулянтными механизмами, что позволяет предотвратить как чрезмерную кровопотерю, так и патологическое тромбообразование. Нарушения в любой части этого баланса могут привести к тяжелым клиническим состояниям, таким как гемофилия, тромбофилия или диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС-синдром).

1.2 Современные гемостатические средства

При возникновении большого количества геморрагических повреждений присущий организму гемостаз оказывается недостаточным для своевременной остановки кровотечения. Требуется вмешательство для стимуляции свертывания крови, иначе это может привести к серьезным осложнениям [28]. Часто используемыми гемостатическими материалами являются хитозан, окисленная целлюлоза, коллаген, желатин, цеолиты, а также биологические агенты – фибрин и тромбин [2, 9, 10]. В том числе применяются лекарственные препараты – транексамовая и аминокaproновая кислоты [27].

Таблица 1 – Классификация гемостатических материалов

Тип	Материал – формы	Механизм	Преимущества	Недостатки
На основе полисахаридов	Хитозан (N-деацетилированный глюкозамин) – порошки, гранулы, бинты.	NH_3^+ электростатически взаимодействует с анионами на поверхности эритроцитов, что приводит к их агрегации вокруг места ранения с образованием тромбов. Происходит активация контактной системы и формируется пространственная сетевая структура.	Биосовместимость, антимикробная, не иммуногенность. Гемостатический эффект через 20-120 секунд.	Менее эффективен при обширных кровотечениях. Обладает ограниченной разлагаемостью в организме.
	Окисленная регенерированная целлюлоза – плёнки, губки, марли, вата порошки.	Контакт с влажной средой запускает процесс выделения целлюлозной кислоты. Низкий pH одновременно с локальной вазоконстрикцией вызывает лизис эритроцитов. Высвобожденный из эритроцитов гемоглобин реагирует с целлюлозной кислотой и образует кислый гематин, который формирует искусственный сгусток.	Нетоксичность, биосовместимость, механическая прочность (из-за растительного происхождения) и низкая стоимость. Антимикробная активность (из-за низкого pH). Гемостаз в пределах 2-8 минут.	Низкий pH может вызывать раздражение тканей, что потенциально может повлиять на скорость заживления при длительном контакте

Продолжение таблицы 1

Неорганические агенты	Цеолиты – порошки.	Отрицательный заряд, способствует поверхностно-зависимой активации фактора XII, изменяя его структуру таким образом, что он становится более восприимчивым к протеолитической активации другими плазменными или клеточными протеазами.	Структурная пористость, биосовместимость. Впитывает большое количество жидкости.	Образование ожогов в результате выделения тепла при гидратации и необходимость ручной компрессии в течение 5-7 мин.
	Фибрин – клен.	Фибрин образуется из фибриногена (фактор I) под действием тромбина. В процессе свертывания крови тромбин расщепляет А- и В-цепи, высвобождая фибринопептиды А и В (FPA и FPB соответственно). FPA быстро отделяется, и оставшаяся молекула представляет собой растворимый мономер фибрина I. Более медленное удаление FPB приводит к образованию фибрина II, который полимеризуется (путем агрегации мономеров фибрина). Образующийся фибрин стабилизируется. Перекрестное сшивание полимеров фибрина, вызванное фактором XIIIa, делает фибриновый сгусток более устойчивым к фибринолизу. Сшитый фибрин – конечный результат каскада коагуляции.	Ускоряет формирование кровяного сгустка. Показан для лечения острых эпизодов кровотечений у пациентов с приобретенным и врожденным дефицитом фибриногена.	Высокая стоимость, риск передачи инфекционных болезней. Необходимость нанесения компонентов последовательно, либо с использованием системы дупложект и аппликационной иглы. Противопоказан для внутрисосудистого применения.

Продолжение таблицы 1

Биологически активные агенты	Тромбин (фактор свертывания крови II) – комбинированные средства.	Превращает фактор свертывания VIII в VIIIa, V в Va, фибриноген в фибрин и XIII в XIIIa. В частности, фактор XIIIa катализирует ковалентные связи между остатками лизина и глутамина, которые содержатся в фибрине. Эти ковалентные связи способствуют повышению стабильности фибринового сгустка. Кроме того, тромбин способствует активации и агрегации тромбоцитов, активируя протеазно-активируемые рецепторы на клеточных мембранах тромбоцитов.	Применяют в комбинации с гемостатическими агентами, влияющими на каскад коагуляции. Не требует промежуточного физиологического агента для своего действия. Гемостаз в течение 3-5 минут. Биодegradация под действием тканевых ферментов за 24 недели.	Может вызывать иммунный ответ и увеличивать риск тромбозов. Тромбоз может быть результатом выработки антител против бычьего тромбина. Эти антитела могут впоследствии вступить в перекрестную реакцию с эндогенным человеческим фактором V и привести к его дефициту.
	Транексамовая кислота – раствор.	Конкурентно и обратимо ингибирует активацию плазминогена, связываясь с несколькими сайтами (низкоаффинными и высокоаффинными), последние участвуют в его связывании с фибрином. Связывание плазминогена с фибрином вызывает фибринолиз. Занимая необходимые места связывания, транексамовая кислота предотвращает растворение фибрина, тем самым стабилизируя тромб и предотвращая кровотечение.	Подтвержден потенцирующий эффект в отношении анальгезирующей активности опиоидных анальгетиков. Подавляет образование кининов и других активных пептидов, участвующих в аллергических и воспалительных реакциях. Местное и системное гемостатическое действие.	Менее эффективна при операциях с повышенным кровотечением.

Продолжение таблицы 1

Лекарственные препараты	Аминокапроновая кислота – раствор.	Обратимо связывается с кольцевым доменом плазминогена и блокирует связывание плазминогена с фибрином и его активацию в плазмин. При отсутствии активации плазмينا происходит снижение фибринолиза.	Может предотвратить образование липопротеина (а) – фактора риска сосудистых заболеваний. Обладает местным и системным гемостатическим действием.	Применение противопоказано при активном внутрисосудистом свертывании и диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови.
На основе белков	Желатин – губки, порошки, гели, стерильные растворы.	Обеспечивает физическую матрицу для иницирования свертывания крови и концентрирует факторы тромбообразования. Благодаря своему объему поглощает жидкость, замедляет ток крови, защищает формирующийся сгусток и создаёт основу для отложения клеточных элементов крови.	Высокая поглощающая способность. Время свертывания крови менее 10 минут. Желатиновая матрица абсорбируется организмом за 4-6 недель.	Набухание может привести к компрессионному некрозу окружающих тканей. Использование в артериальных кровотечениях вызывает эмболию. Возможный очаг инфекции.
	Коллаген – порошки, тканеподобные материалы, губки или небольшие прокладки.	Активирует внутренний путь коагуляционного каскада и включает процесс свертывания крови при контакте фибрилл коллагена с тромбоцитами. Агрегированные тромбоциты подвергаются морфологическим изменениям – дегранулируются, высвобождая АДФ, серотонин, тромбоксан A2, которые помогают сформировать сгусток.	Биосовместимость, биоактивность, биоразлагаемость. Возможность удаления материала из места нанесения без риска возобновления кровотечения, так как каскад коагуляции уже был иницирован. Высокая сорбционная способность, при практически низменном объеме. Гемостаз в пределах 2-5 минут.	При массивном, кровотечении губка «смывается» с раневой поверхности. Полагается исключительно на активацию тромбоцитов.

Стоит отметить, что на сегодняшний день в литературе отсутствует общепринятая классификация местных кровоостанавливающих материалов.

Полисахаридные материалы благодаря способности инициировать коагуляцию, биосовместимости и антибактериальным свойствам являются популярными гемостатиками. Хитозан характеризуется быстрым действием (через 20-120 секунд), однако обладает ограниченной биоразлагаемостью [24, 33, 52]. Окисленная регенерированная целлюлоза, несмотря на биосовместимость и дополнительный бактерицидный эффект, понижает локальный pH (до 2,5 - 3,0) и тем самым инактивирует действие тромбина. Также не рекомендуется применять материал при наличии серозного отделяемого в ране, так как другие жидкости организма, кроме крови, не реагируют с окисленной целлюлозой [9, 30, 47].

Неорганические агенты имеют высокую абсорбционную способность и гарантируют отсутствие острых иммунологических реакций. Недостатком является невозможность удаления микрочастиц из восстанавливающейся ткани. Кроме того, применение ограничено риском ожогов [2, 32].

Биологические агенты показаны в случаях, когда борьба с кровотечением с помощью стандартных хирургических методов (шов, лигатура или прижигание) неэффективна или труднодоступна. Однако их применение сопряжено с высоким риском иммунного ответа и осложнениями в виде тромбозов. Фибриновый клей используется в дополнение к стандартным мерам для достижения гемостаза, герметизации или склеивания тканей и ускорения заживления ран. Клеи являются многокомпонентными препаратами и перед применением должны быть смешаны, что создает определённые неудобства. Чрезмерная толщина слоя фибринового герметика может повлиять на эффективность препарата и процесс заживления [18, 27, 51]. Тромбин местного действия можно использовать в сочетании с другими гемостатическими средствами. Невозможность свертывания крови возникает в том случае, если первичным дефектом свертывания является отсутствие

фибриногена как такового. Необходимость использования свежей тромбоцитарной массы и ее дефицит технологически ограничивает получение материала. Срок хранения тромбоцитарной массы ограничен (3 суток при 20-22°C). Следует отметить, что тромбоциты – крайне лабильные форменные элементы, и при малейших дефектах хранения легко агрегируют и распадаются. Поврежденные тромбоциты не используются для трансфузии, а просто утилизируются [9, 27].

Лекарственные препараты являются конкурентными (при высоких концентрациях – неконкурентными) ингибиторами активации пламиногена и его превращения в плазмин. Обладают системным и местным гемостатическим действием, способны подавлять распад тромбов и улучшать эффект герметизации ран. Транексамовая кислота проявляет противовоспалительную и противоаллергическую активность, но менее эффективна при интенсивных кровотечениях. Терминальный период выведения – приблизительно 11 часов [14, 26, 27]. Аминокапроновая кислота дополнительно снижает риск сосудистых заболеваний, однако имеет противопоказания при активном внутрисосудистом свертывании. В этих случаях аминокапроновую кислоту можно применять, если вводить её одновременно с гепарином. Профилактическое использование аминокапроновой кислоты стало основным фармакологическим подходом к сохранению крови во время операций на сердце с тех пор, как апротинин был снят с клинического применения. Средний период полувыведения аминокапроновой кислоты составляет примерно 2 часа [27, 31, 37].

Белковые биоматериалы получили широкое распространение благодаря высокой механической прочности и способности создавать физическую матрицу для свертывания крови. Использование коллагеновых и желатиновых гемостатических губок в хирургии является стандартной практикой. Они часто используются при гемостазе паренхиматозных кровотечений, например, при операциях на печени, где использование механического гемостаза

невозможно. Однако увеличение желатина в размере на 200% *in vivo* ограничивает его применение, так как приводит к грубым неврологическим осложнениям. Главный недостаток желатина в его бактериоёмкости, в дальнейшем он может стать очагом инфекции [2, 43]. Коллаген характеризуется быстрой активацией свертывания (2-5 минут), биосовместимостью и возможностью удаления материала без повторного кровотечения. Однако нативный коллаген может способствовать бактериальному росту. А при интенсивных кровотечениях может быть недостаточно устойчив на раневой поверхности [33, 38, 46].

1.3 Коллаген как биоматериал

Коллаген является основным биополимером и наиболее распространенным компонентом внеклеточного матрикса тканей млекопитающих. К настоящему времени описано 29 типов коллагеновых белков, различающихся по аминокислотной последовательности, расположению в тканях и биологической роли, при этом наиболее распространенным в организме является коллаген I типа. Повторяющиеся первичные структурные единицы в основном представляют собой $[Gly-X-Y]_n$, где *Gly* – глицин, а *X* и *Y* – чаще всего остатки пролина и гидроксипролина. Молекулярная масса коллагена варьирует в зависимости от типа, среднее значение составляет около 300 кДа, который имеет тенденцию к самосборке в тройные спиральные конфигурации, образуя нанопфибриллы с типичными размерами 300 нм в длину и 1,5 нм в диаметре. Коллаген содержится в соединительных тканях, таких как хрящи, кости, сухожилия и связки, обеспечивает прочность и структурную поддержку тканей, а также участвует в клеточной сигнализации и миграции [38].

Благодаря своей биосовместимости, биоактивности, биоразлагаемости, низкой иммуногенности, невысокой стоимости, а также механическим

свойствам – коллаген и его производные считаются наиболее предпочтительными материалами в биомедицинской инженерии [15, 38, 46].

Коллагенсодержащие биоматериалы можно получить двумя способами:

1. Максимально сохранив форму исходной ткани путем выделения децеллюляризованного внеклеточного матрикса. Процедуры очистки в данном методе играют ключевую роль, поскольку удаление или поддержание определенных остатков может сильно повлиять на их биосовместимость или механические свойства;

2. Путем полимеризации *in vitro* растворимого тропоколлагена, отдельно или в сочетании с другими компонентами внеклеточного матрикса, такими как гликозаминогликаны, эластин или хитозан. Эти добавки призваны улучшить ферментативную устойчивость и механические свойства полученного биоматериала [46].

Коллаген может быть получен из тканей любого животного (в основном это отходы бычьей и свиной кожи, костей). Однако риск губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, трансмиссивной губчатой энцефалопатии, аллергических реакций, а также религиозных ограничений в последнее время заставляют рассматривать другие источники коллагена. Извлечение коллагена из морских организмов является более безопасным и экономичным альтернативным методом [50].

Современные биотехнологии позволяют производить рекомбинантный коллаген с использованием генетически модифицированных микроорганизмов. Это снижает риск иммуногенных реакций.

Развитие медицинского использования коллагена до настоящего времени было скорее экстенсивным, чем интенсивным. В зависимости от области применения биоматериалы на основе коллагена могут использоваться в виде:

- коллагеновых губок, применяемых в качестве трёхмерных скаффолдов для восстановления костей, хрящей или наполнителей тканей. Также для создания кровоостанавливающих материалов, способных к

комбинированию и сополимеризации с различными полимерами, биологически активными и лекарственными веществами;

- двумерных тонких пленок или мембран для перевязки ран, закрытия швов, укрепления скомпрометированных тканей и направленной регенерации тканей;
- инъекционных гидрогелей для доставки лекарств [15, 46].

По этим причинам могут быть получены сублимированные губки на основе коллагена с широким спектром свойств, что уже привело к созданию успешных коммерческих медицинских устройств, в основном для стоматологического, ортопедического и гемостатического применения [38].

При использовании в виде губки коллаген создает трехмерный каркас и поддерживает рост клеток. Он действует как связующий и поддерживающий агент для клеток, а ещё играет решающую роль в прикреплении, распространении и пролиферации клеток. Кроме того, коллагеновые губки улучшают показатели гемостаза, способствуют прикреплению и кластеризации тромбоцитов, а также высвобождают компоненты коагуляции, способствующие свертыванию крови [50].

Микроструктура коллагена может быть использована для загрузки лекарственных препаратов для достижения более быстрого гемостатического эффекта [6]. Коллагеновые губки в комбинации с активными веществами действуют эффективнее обычного тампонирования, они останавливают кровотечение в два раза быстрее [11].

Коллагеновые материалы широко используются в качестве местных гемостатических средств (в форме порошка, нетканого материала, губки). Гемостатическая активность этих материалов недостаточна. Для ее повышения в состав коллагеновой субстанции вводят вещества, влияющие на отдельные звенья процесса свертывания крови: фибриноген, тромбин, аprotинин, эpsilon-аминокапроновая кислота и др. Некоторые данные

рандомизированных контролируемых исследований касаются использования фибриновых герметиков самих по себе или в сочетании с коллагеновым волокном. Системный гемостаз может быть достигнут с помощью аналогов лизина, таких как аминокaproновая кислота или транексамовая кислота и апротинин, которые являются ингибиторами фибринолиза [19].

Замедленное заживление ран, вызванное бактериальной инфекцией и стойкой воспалительной реакцией, остается серьезной клинической проблемой [35]. Коллаген не обладает антимикробными свойствами, наоборот, может служить питательной средой для развития бактериальной микрофлоры. Поэтому важно придать коллагеновым губкам антибактериальную активность [6]. Гемостатический и антибактериальный композитный материал позволяет ранам быстрее заживать и тем самым облегчать лечение пациента [24].

1.4 Имплантат-ассоциированные инфекции

С одной стороны, биомедицинские имплантаты произвели революцию в медицине и открыли новые возможности для прогресса в области здоровья человека, но с другой – имплантация медицинского устройства увеличивает риск инфицирования тканей организма [44].

Инфекции, которые не присутствовали и не инкубировались во время госпитализации пациента и были приобретены после 48 ч госпитализации определяются как нозокомиальные инфекции [20, 21].

Все имплантируемые медицинские изделия, начиная с временных, вводимых и извлекаемых на ранних стадиях (мочевые катетеры, эндотрахеальные трубки) и заканчивая более долговременными хирургическими имплантами (сердечные клапаны, эмболические катушки, сосудистые трансплантаты, тазобедренные, коленные и плечевые суставы, кардиостимуляторы, коронарные стенты), подвержены инфекциям, связанным с устройством или имплантатом [42].

В возникновении нозокомиальных инфекций участвуют несколько грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*) и грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecalis*) бактерий [20, 39, 44, 48]. Их способность образовывать биопленку усложняет лечение этих инфекций.

Биопленка – это неподвижная сложная структура, состоящая из одного или нескольких видов бактерий, клеток хозяина и побочных продуктов жизнедеятельности клеток, которые необратимо прикреплены к субстрату и окружены внеклеточным полимерным веществом, вырабатываемым бактериями. По оценкам, бактериальные биопленки участвуют в 65 % случаев нозокомиальных инфекций и более чем в 80 % хронических инфекций [20, 21, 39, 44]. Состав биопленки – это 10 % микробной массы и 90 % воды. 50-90 % всего органического компонента биопленки приходится на полисахариды, образующие матрикс. Цепочки полисахаридов сплетены вместе в плотную, похожую на сетку структуру [48].

Образование биопленок демонстрирует адаптивный механизм устойчивости бактерий к антибиотикам, а также обход защитных систем хозяина. Матрица биопленки также препятствует проникновению антибиотиков в клетки, способствуя общей резистентности. Эта структура также способствует передаче генов устойчивости к антимикробным препаратам между видами и внутри них, защищает от проникновения лекарств и увеличивает их персистенцию [21].

Формирование биопленки на медицинском изделии происходит следующим образом:

1. Обратимое прикрепление одиночных планктонных бактерий к поверхности. Первое прикрепление бактерий происходит под влиянием притягивающих или отталкивающих сил, создаваемых уровнем питательных веществ, pH и температурой поверхности.

2. Агрегация бактерий и необратимое прикрепление к поверхности.
3. Формирование внешнего матрикса из многослойных сложных биомолекул, образование микроколоний и секреция ЭПС, составляющих внешний матрикс. Секреция полисахаридов у штаммов, образующих биопленку, обеспечивает агрегацию, адгезию и толерантность к поверхности, что позволяет улучшить колонизацию поверхности.
4. Созревание биопленок и приобретение ими трехмерной структуры по мере достижения зрелости. Эти трехмерные структуры опираются на самостоятельно вырабатываемые компоненты внеклеточного матрикса.
5. Полностью созревшие биопленки отделяются, что позволяет бактериальным клеткам снова принять планктонное состояние и таким образом создать биопленку в других местах [20, 21, 48].

Формирование биопленки частично контролируется *quorum sensing* – механизмом межбактериальной коммуникации, зависящим от плотности популяции [25].

В целом, при отсутствии инородного тела заражение тканей условно-патогенными микроорганизмами обычно спонтанно очищается иммунным защитным механизмом хозяина. В отличие от этого, при инфекциях имплантов биоматериал активирует местную реакцию тканей. Она состоит из острого и хронического воспаления, реакции инородного тела, образования грануляционной ткани и, наконец, фиброзной инкапсуляции. Бактерии могут попасть в организм человека во время медицинской процедуры при контакте с медицинским работником, бактериями, живущими на коже пациента, и т. д.

В случае с имплантируемыми медицинскими устройствами антимикробные покрытия имеют ряд преимуществ перед традиционными антибиотиками. Ключевым преимуществом является их локальное действие, когда покрытие защищает непосредственную поверхность имплантата от микробной атаки, не затрагивая отдаленные ткани [21, 42, 44].

Для модификации поверхности материалов используются различные процедуры, которые могут быть механическими, физическими, химическими и биологическими, включая встраивание или диффузию нового соединения на поверхность имплантата, что создает дополнительный слой, борющийся с микробами. Различные антибактериальные агенты, такие как антибиотики (тигециклин, ванкомицин, амоксициллин и др.), пептиды, ферменты, органические и неорганические соединения, металлы или ионы металлов (серебро, медь, цинк), были интегрированы в поверхность имплантируемых медицинских устройств. Эффективность и безопасность этих агентов зависит от их концентрации, поскольку от дозировки зависит как их антимикробная активность, так и потенциальная токсичность для клеток хозяина [42].

В последнее время возрос интерес к использованию скаффолдов, которые могут одновременно способствовать регенерации тканей и служить устройствами для локальной доставки лекарств. Такими свойствами обладает коммерчески доступный коллагеновый матрикс *Fibro-Gide®*. Матрикс способен загружать и устойчиво высвобождать антимикробный препарат гентамицин в течение 14 дней. Также *Fibro-Gide®* демонстрирует цитосовместимость *in vitro* в присутствии гентамицина. Наконец, в исследовании не обнаружено существенных различий между интерфейсом ткань-скаффолд у животных, которые получали либо нативное устройство, либо устройство с высокой дозой (40 мг/кг) гентамицина [39].

Другая коллагеновая мембрана была модифицирована наночастицами гидроксиапатита (*HApNPs*) и низкомолекулярного хитозана для усиления его антибактериальных и остеоиндуктивных свойств. Антимикробный эффект на был продемонстрирован для грамотрицательных бактерий, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* [40].

Хотя биопленки трудно поддаются традиционной антибиотикотерапии, они демонстрируют определенную восприимчивость к лекарственным препаратам при правильном применении и в больших количествах. При

местном применении цефалоспорины, аминогликозиды, монобактамы, полимиксины, тетрациклины и гликоглицины показали свою эффективность в борьбе с биопленками. Ингаляционные антибиотики, такие как колистин, тобрамицин, азтреонам, цiproфлоксацин, левофлоксацин или гентамицин, оказались эффективными при лечении легочных биопленочных инфекций. Было доказано, что нанесение некоторых антибиотиков непосредственно на трубки или медицинское оборудование, например, ванкомицина, миноциклина, линезолида, рифампицина или цефалоспоринов, может уменьшить рост биопленок [48].

Профилактическое назначение антибиотиков является доказанной стратегией снижения риска инфекций, и считается стандартной клинической практикой. Многочисленные исследования показали, что применение профилактических антибиотиков может значительно снизить частоту инфекций, связанных с устройством, по сравнению с отсутствием антибиотикотерапии, причем относительное снижение риска составляет от 40 до 95 % [17].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования является коллагеновая 3D-матрица, пропитанная лекарственными средствами: аминокaproновой кислотой в концентрации 50 мг/мл и антибиотиками – ванкомицином (2,5 мг/мл) и ципрофлоксацином (0,5 мг/мл).

Выбор дозировки аминокaproновой кислоты основан на данных из научной литературы и патентов, в которых указано, что 5% раствор (50 мг/мл) активно применяется в составе биополимерных гемостатических материалов. Такая концентрация обеспечивает быстрый гемостатический эффект и предотвращает распад формирующегося тромба [5,13].

Исследования по контролируемому высвобождению ванкомицина из коллаген-связанных пептидных наночастиц показали, что концентрации в диапазоне 2–5 мг/мл обеспечивают устойчивое высвобождение антибиотика, поддерживая его уровень выше минимальной подавляющей концентрации для грамположительных бактерий, включая *MRSA*, в течение нескольких дней [34].

Исследования показали, что образцы на основе поливинилпирролидона, пропитанные 0,5 мг/мл ципрофлоксацина полностью уничтожали биоплёнки, сформированные бактериями в количестве до 1×10^9 КОЕ/рана. Кроме того, данная концентрация признана безопасной для тканей и не замедляет заживление ран [45].

2.1 УФ-спектрофотометрия как метод количественного анализа лекарственных средств

Оценка характеристик комбинированных гемостатических композиций представляет собой определенную сложность. В первую очередь это касается проверки их стабильности и количественного содержания всех компонентов. В качестве метода измерения выбрали спектрофотометрию – широко

применяемый в фармацевтическом анализе способ, позволяющий идентифицировать примеси и определять концентрацию веществ. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии – изменение интенсивности поглощённого света от длины волны.

2.1.1 Метод количественного определения аминокaproновой кислоты

Количественное определение аминокaproновой кислоты базируется на реакции с нингидрином, в результате которой образуется комплекс сине-фиолетового цвета. В ходе выполнения эксперимента методика Барсуковой Ю.Н. и соавторов [1] была адаптирована с учётом специфики исследования, включая диапазон определяемых концентраций и чувствительность используемого спектрофотометра. Рабочий интервал концентраций был установлен в пределах 30-150 мкг/мл, что обеспечивало надёжность и воспроизводимость результатов. Адаптированный метод оказался пригоден для анализа содержания аминокaproновой кислоты в многокомпонентных лекарственных формах.

2.1.2 Метод количественного определения ванкомицина

Для измерений поглощения ультрафиолетового излучения использовали спектрофотометр Varian Cary 50, оснащенный кварцевой кюветой толщиной 1 см. Параметры сбора данных включали диапазон длин волн 250 -700 нм [8].

Исходный раствор (100 мкг/мл) готовили путём растворения 100 мг порошка ванкомицина в воде. Стандартные растворы были приготовлены путём соответствующего разбавления исходных растворов водой для построения калибровочного графика.

Таблица 2 – Приготовление стандартных растворов ванкомицина в воде

С, мкг/мл	V _{ванкомицина} (100 мкг/мл), мл	V _{воды} , мл
5	0,5	9,5
10	1	9
15	1,5	8,5
20	2	8
25	2,5	7,5
30	3	7
35	3,5	6,5
40	4	6
50	5	5
60	6	4
70	7	3
80	8	2
90	9	1
100	10	0

2.1.3 Метод количественного определения ципрофлоксацина

Обзор литературы показал, что было разработано несколько аналитических методов для количественной оценки ципрофлоксацина отдельно или в комбинации с другими лекарственными препаратами или продуктами деградации. УФ-спектрофотометрия представляет собой простой, быстрый и экономически эффективный аналитический метод, который обеспечивает хорошую чувствительность для определения антибиотиков фторхинолонов. Параметры сбора данных включали диапазон длин волн от 200 до 390 нм [17].

Исходный раствор (100 мкг/мл) готовили путём растворения 500 мг таблетки ципрофлоксацина в 10% уксусной кислоте. Для построения калибровочного графика был осуществлен выбор стандартных растворов

ципрофлоксацина. Стандартные растворы были приготовлены путём соответствующего разбавления исходных растворов уксусной кислотой.

Таблица 3 – Приготовление стандартных растворов ципрофлоксацина в воде

С, мкг/мл	V _{ципрофлоксацина} (100 мкг/мл), мл	V _{10% уксусной кислоты} , мл
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5
6	6	4

2.2 Оценка сорбционной ёмкости коллагеновой матрицы

Для определения сорбционной ёмкости при отсутствии внешнего давления измеряют объём воды, который способен поглотить сухой сорбент. Из 3D-коллагеновой матрицы вырезали образцы площадью 1 см², толщина образцов – 2 мм. Предварительно взвешенные квадраты матрицы погружали в дистиллированную воду при 25 °С на два часа, затем извлекали, промокали фильтровальной бумагой для удаления поверхностной влаги и снова взвешивали [4]. Разницу в массе использовали для расчёта коэффициента набухания S % по формуле:

$$S(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

где W₁– масса влажного образца, г; W₂– масса сухого образца, г.

2.3 Исследование кинетики высвобождения лекарств из гемостатического изделия в условиях *in vitro*

В каждой серии эксперимента исследовали по три образца матрицы (квадраты площадью 1 см² и толщиной 2 мм, пропитанные аминокaproновой

кислотой и антибиотиками). Каждый образец помещали в пластиковую пробирку с 4 мл дистиллированной воды в термостат при 37 °С. Смену среды проводили через 5, 15, 30, 60 и 120 минут от старта опыта, а также через 24 и 72 часа. После каждой замены отбирали пробу раствора и измеряли концентрацию лекарственного вещества методом спектрофотометрии.

2.4 Изучение скорости резорбции биоматериала в условиях *in vitro*

Эксперименты проводили в пластиковых стаканах с 60 мл модельной среды при 37 °С. В качестве контрольной среды использовали физиологический раствор, а для оценки окислительной деструкции – реактив Фентона (рН 7,4), содержащий 100 мкмоль/л сульфата железа (Fe^{2+}) и 1 ммоль/л 37 % H_2O_2 . У образцов коллагеновой матрицы (квадраты площадью 1 см² и толщиной 2 мм) перед инкубацией определяли массу. Пробы извлекали на 3-й, 7-й и 14-й день, сушили до постоянной массы (точность 0,001 г) и повторно взвешивали. Процентное изменение массы гемостатического материала до и после инкубации отражало темпы резорбции [3, 7].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты спектрофотометрического определения аминокапроновой кислоты

При модификации методики учитывались такие параметры, как длина волны, pH среды и объем аликвоты.

1) Выбор длины волны

На первом этапе изучали УФ-спектры поглощения аминокапроновой кислоты с помощью спектрофотометра Varian Cary 50 в диапазоне длин волн 300-700 нм. В результате анализа полученного спектра выявлен характеристический пик для аминокапроновой кислоты на длине волны 568 нм (рис. 1).

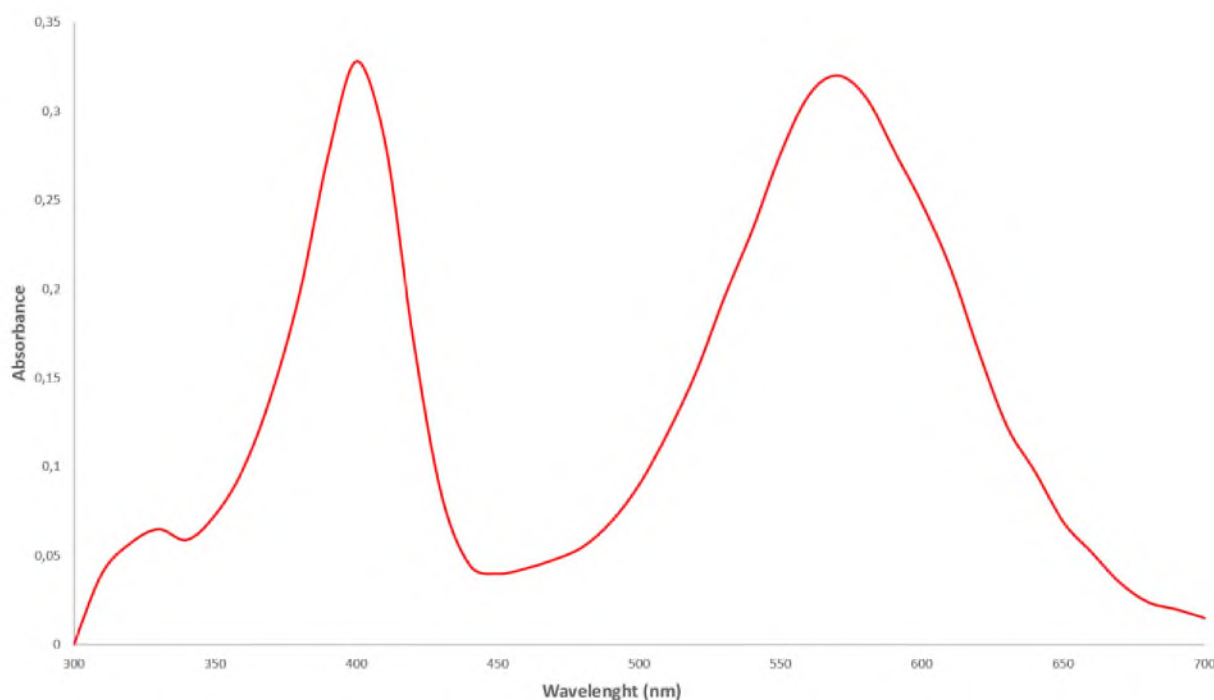


Рисунок 1. Спектр поглощения раствора аминокапроновой кислоты

2) Выбор оптимального значения pH

Для изучения спектральных характеристик ϵ -аминокапроновой кислоты приготовили фосфатные буферные растворы с pH 6,0; 6,2; 6,4; 6,8 и 7,2. В

каждом измеряли оптическую плотность раствора, чтобы проследить, как меняется поглощение вещества при разных степенях его ионизации. По полученным данным построили график зависимости оптической плотности от рН (рис. 2). Максимальное поглощение аминокaproновой кислоты приходится на значение рН 6,4.

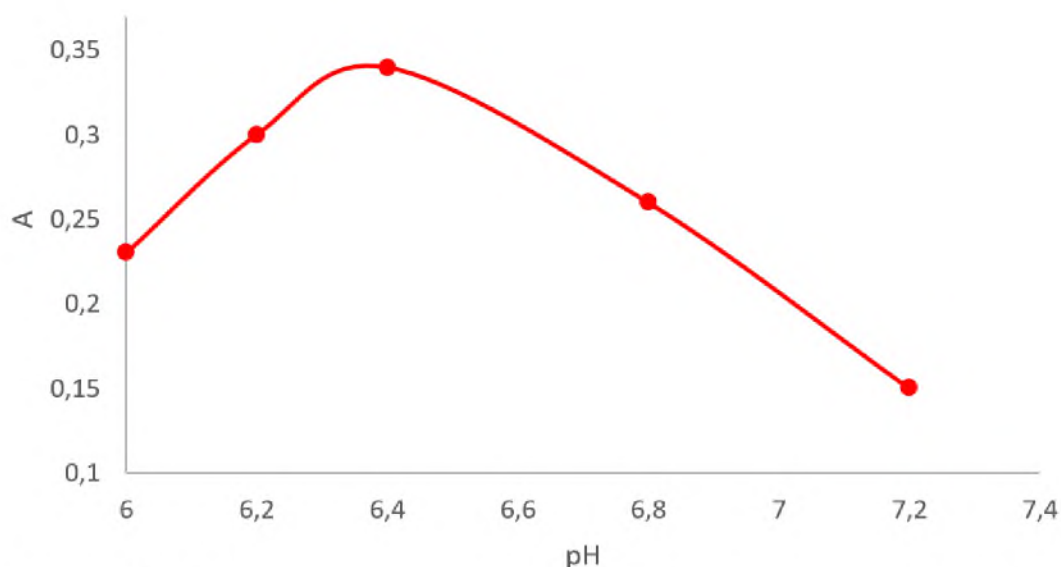


Рисунок 2. Изменение оптической плотности в зависимости от рН раствора, $\lambda=568$ нм

3) Приготовление раствора сравнения

В мерный цилиндр помещали 300 мкл воды, 400 мкл фосфатного буферного раствора с рН 6,4, 200 мкл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 95%, 200 мкл 0,5 мг/мл водного раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое цилиндра нагревали на кипящей водяной бане 30 минут, затем охлаждали ледяной водой, доводили объём до 10 мл дистиллированной водой и перемешивали. После этого оптическую плотность раствора регистрировали при 568 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см.

4) Приготовление раствора стандартного образца

Дозатором отмерили 10 мл исходного раствора аминокaproновой кислоты (50 мг/мл) и перенесли его в мерную колбу объёмом 100 мл. Добавили

дистиллированную воду до метки и тщательно перемешали – получили стандартный раствор А с концентрацией 5 мг/мл.

В пяти мерных цилиндрах из раствора А приготовили серию растворов аминокaproновой кислоты с концентрациями 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл (раствор В).

Таблица 4 – Приготовление стандартных растворов аминокaproновой кислоты

№ раствора В	С, мг/мл	V _{раствора А} , мкл	V _{воды} , мкл
1	1	200	800
2	2	400	600
3	3	600	400
4	4	800	200
5	5	1000	0

В пять мерных цилиндров помещали по 300 мкл раствора В, в каждый добавляли 400 мкл фосфатного буферного раствора с рН 6,4, 200 мкл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 95%, 200 мкл 0,5 мг/мл водного раствора аскорбиновой кислоты.

Приготовленные в цилиндрах растворы нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем быстро охлаждали, разбавляли дистиллированной водой до 10 мл и тщательно перемешивали. Итоговые концентрации аминокaproновой кислоты в образцах составили 30, 60, 90, 120 и 150 мкг/мл соответственно.

У полученных растворов измеряли оптическую плотность на длине волны 568 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см. По полученным данным построили калибровочный график (рис. 3).

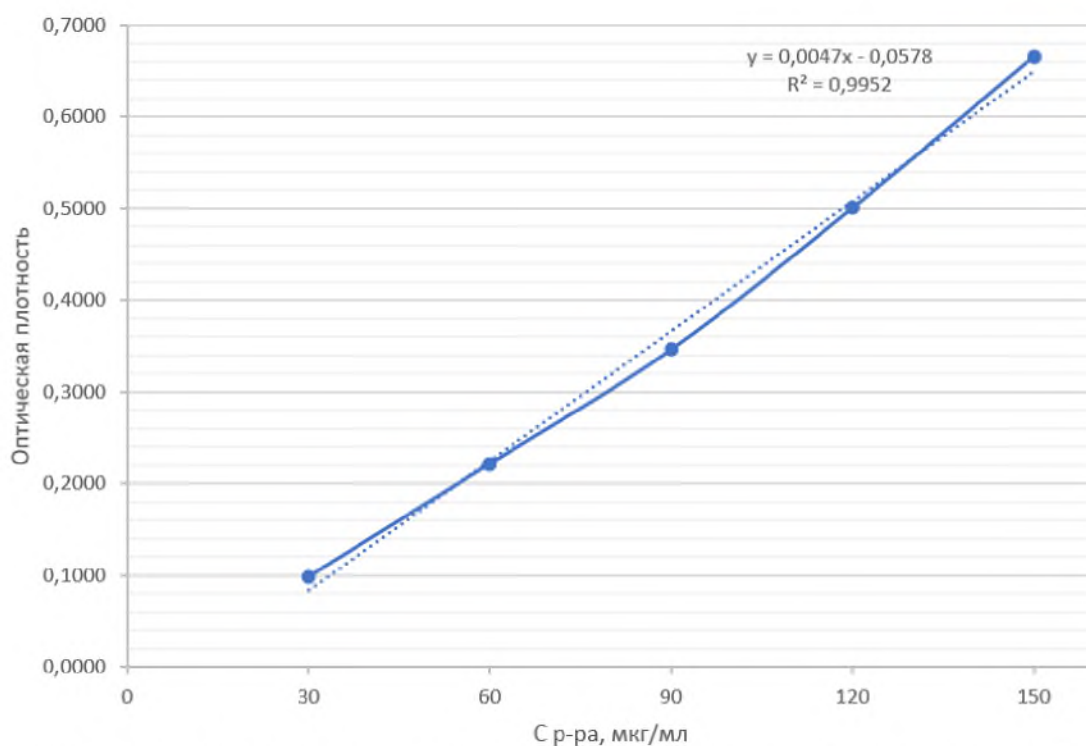


Рисунок 3. Калибровочный график для аминокaproновой кислоты, $\lambda=568$ нм

Для оценки линейности методики провели измерения в пяти точках – при концентрациях 30, 60, 90, 120 и 150 мкг/мл. Поскольку во всём диапазоне экспериментальных данных соблюдаются требования линейной модели ($R^2 \geq 0,99$), аналитический интервал методики определён в пределах 30-150 мкг/мл.

Таблица 5 – Результаты методики по показателю линейность

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y=0,0047x-0,0578$ $R^2=0,9952$
Наклон (a)	0,0047
Коэффициент корреляции	$R^2=0,9952$
Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал	-0,0578

Параметр b градуировочной функции характеризует отрезок, отсекаемый на оси ординат и отражает уровень «фонового» сигнала без аналита, а угол наклона прямой (коэффициент a) характеризует чувствительность метода.

На основании анализа этих параметров оптимальными условиями методики были выбраны: длина волны 568 нм и фосфатный буфер с pH 6,4.

3.2 Результаты спектрофотометрического определения ванкомицина

В результате анализа полученного УФ-спектра ванкомицина был обнаружен его характерный максимум на длине волны 280 нм (рис. 4).

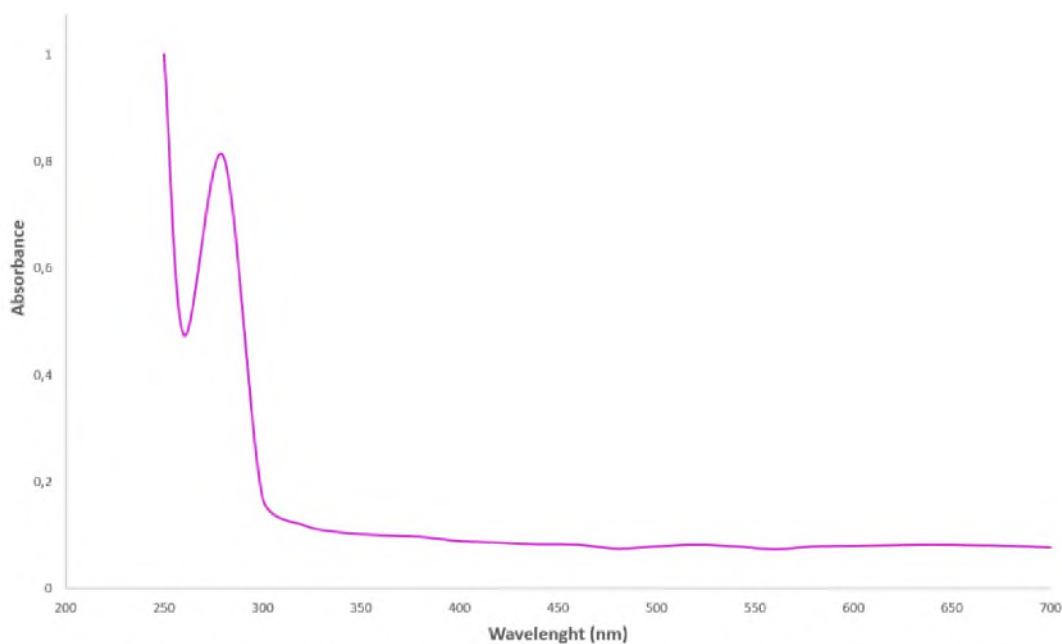


Рисунок 4. Спектр поглощения раствора ванкомицина

Для построения калибровочного графика был осуществлен выбор стандартных растворов ванкомицина в воде с концентрациями 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мкг/мл. У полученных растворов измеряли оптическую плотность на длине волны 280 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см (рис. 5).

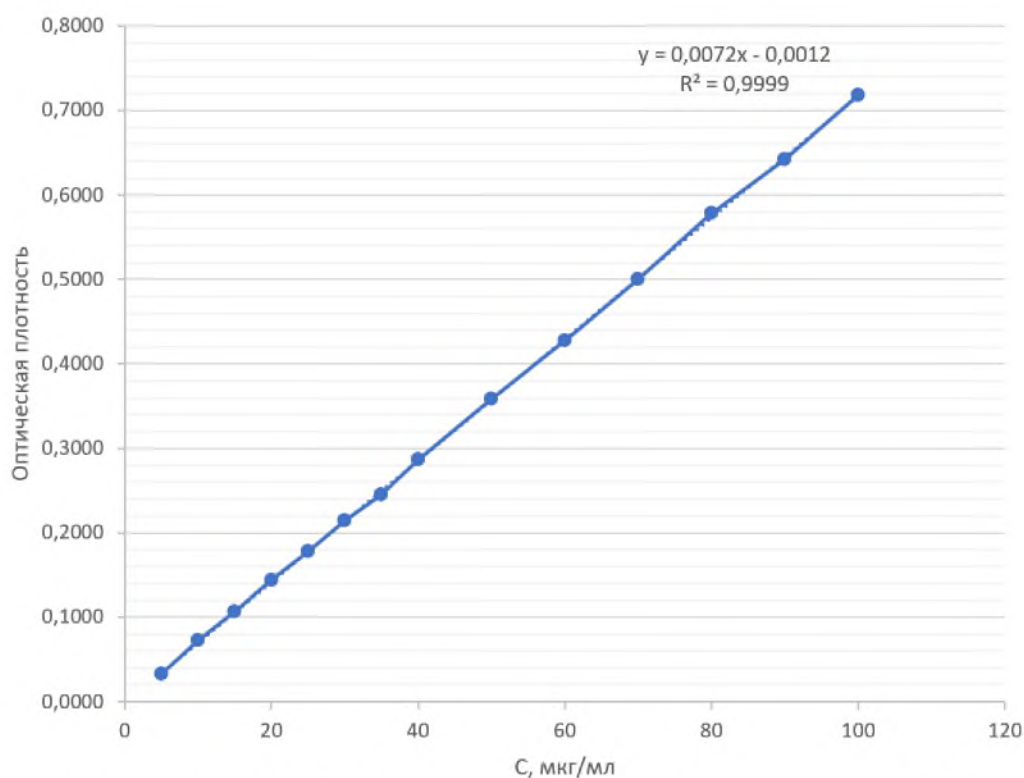


Рисунок 5. Калибровочный график для ванкомицина, $\lambda=280$ нм

Линейность доказывалась на 14 различных разведениях ванкомицина в воде. Поскольку на всём диапазоне экспериментальных данных соблюдаются требования линейной модели ($R^2 \geq 0,99$), аналитический интервал методики определён в пределах 5-100 мкг/мл.

Таблица 6 – Результаты методики по показателю линейность

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y=0,0072x-0,0012$ $R^2=0,9999$
Наклон (a)	0,0072
Коэффициент корреляции	$R^2=0,9999$
Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал	-0,0012

3.3 Результаты спектрофотометрического определения ципрофлоксацина

При изучении УФ-спектра выявлен характеристический пик для раствора ципрофлоксацина в 10% водной уксусной кислоте на длине волны 280 нм (рис. 6).

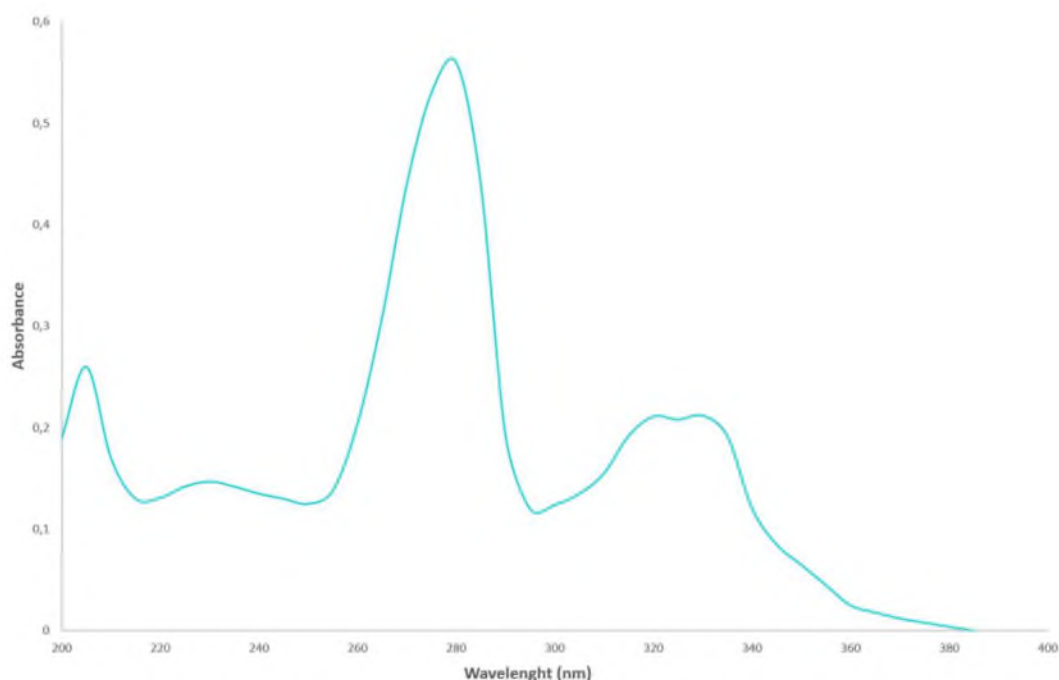


Рисунок 6. Спектры поглощения раствора ципрофлоксацина

Для построения калибровочного графика был осуществлен выбор стандартных растворов ципрофлоксацина в 10% водной уксусной кислоте с концентрациями 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мкг/мл.

У полученных растворов измеряли оптическую плотность на длине волны 280 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см (рис. 7).

Линейность доказывалась на 6 различных разведениях ципрофлоксацина в 10% уксусной кислоте. На всём диапазоне экспериментальных данных соблюдаются требования линейной модели ($R^2 \geq 0,99$), аналитический интервал методики определён в пределах 1-6 мкг/мл.

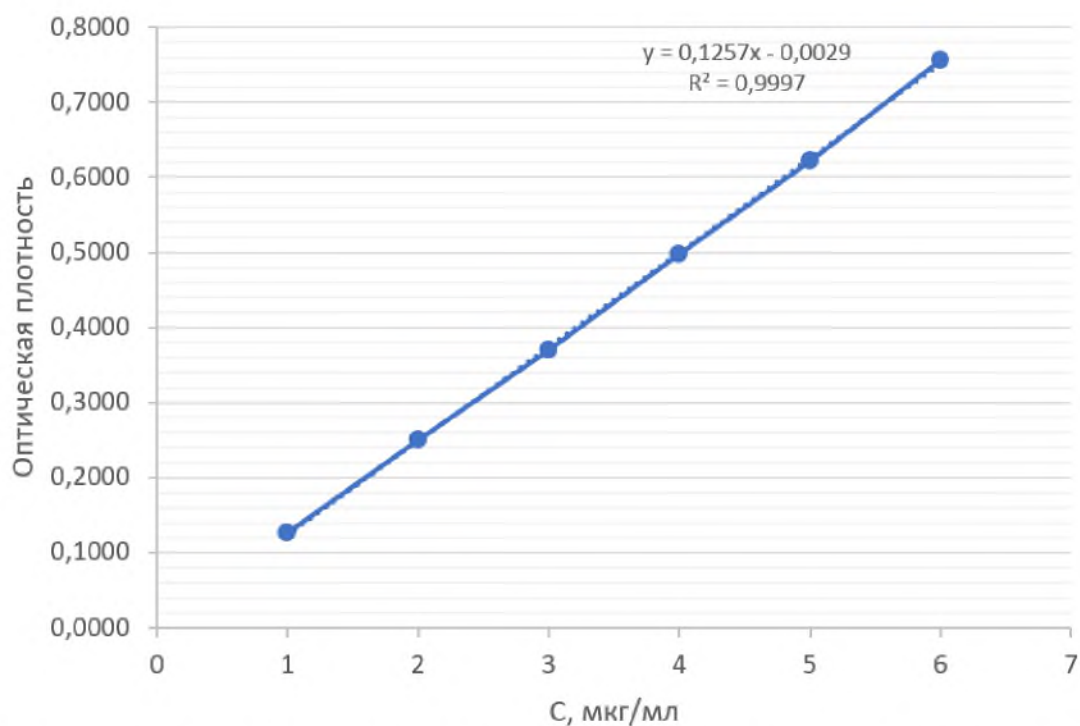


Рисунок 7. Калибровочный график для ципрофлоксацина в 10% водной уксусной кислоте, $\lambda=280$ нм

Таблица 7 – Результаты методики по показателю линейность

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y=0,1257x-0,0029$ $R^2=0,9997$
Наклон (a)	0,1257
Коэффициент корреляции	$R^2=0,9997$
Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал	-0,0029

Стоит отметить, что выбор системы разбавителя (10% водная уксусная кислота) имел решающее значение для оптимизации эффективности метода и его применимости. Этот выбор был основан на нескольких ключевых факторах. Во-первых, кислая среда способствует стабильности растворов фторхинолонов, что имеет решающее значение для поддержания стабильных

спектральных характеристик с течением времени. Во-вторых, рН-зависимая растворимость фторхинолонов требует кислой среды для обеспечения полного растворения и поддержания лекарств в их протонированной, более растворимой форме [17].

Для сравнения – в качестве растворителя ципрофлоксацина выбрали дистиллированную воду. Пять мерных цилиндров были заполнены рабочими водными стандартными растворами ципрофлоксацина для достижения конечных концентраций 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мкг/мл. Затем была измерена оптическая плотность на длине волны 280 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см (рис. 8).

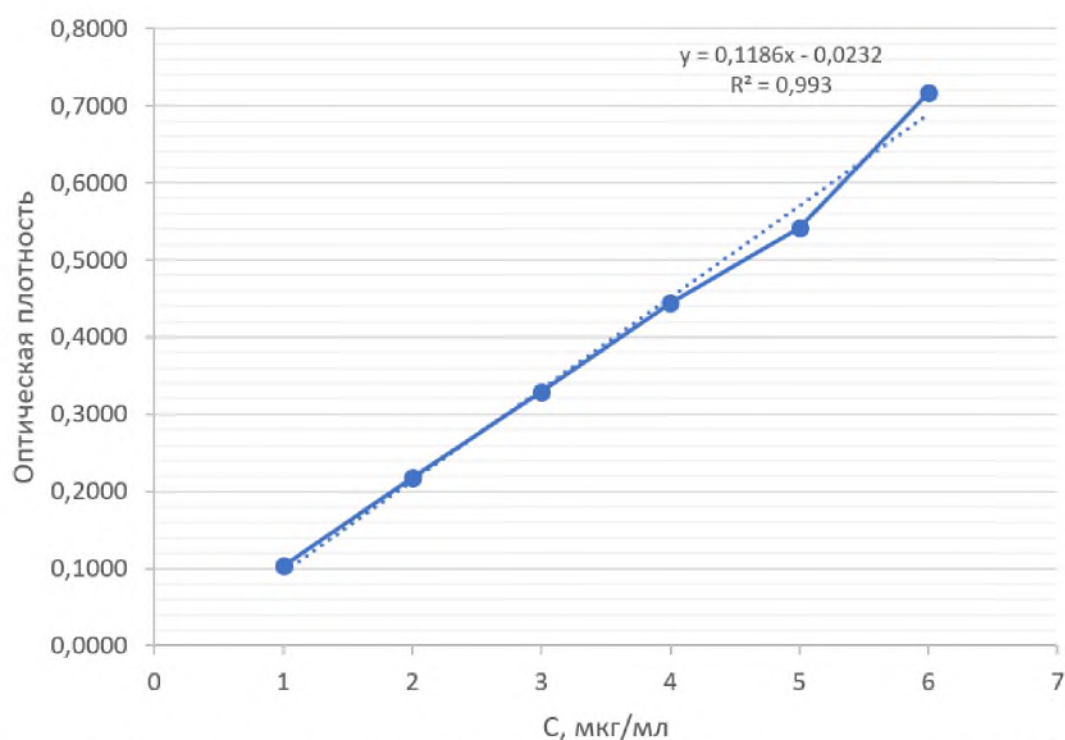


Рисунок 8. Калибровочный график для ципрофлоксацина в воде, $\lambda=280$ нм

3.4 Результаты изучения сорбционных свойств коллагеновой матрицы

На скорость поглощения жидкости главным образом влияет природа полимера, а сорбционная способность определяется объемом пор. Образцы

коллагеновой матрицы предварительно взвешивали в сухом виде (по 0,017 г каждый), а затем опускали в дистиллированную воду при 25 °С на 2 ч. По истечению времени образцы извлекали, фильтровальной бумагой удаляли поверхностную влагу и вновь взвешивали. Таким образом, каждый образец впитал в себя значительный объём воды, увеличив массу почти в шесть раз (до 0,101 г, 0,103 г и 0,104 г). Полученный коэффициент набухания (в среднем 83,4 %) указывает на высокую пористую структуру матрицы и отличную способность удерживать влагу – ключевые характеристики для её эффективного применения в качестве гидрогеля и носителя биологически активных веществ.

3.5 Результаты кинетики высвобождения лекарств гемостатического изделия в условиях *in vitro*

Для изучения кинетики высвобождения лекарственных веществ образцы коллагеновой матрицы предварительно пропитывали раствором аминокaproновой кислоты (50 мг/мл) с добавлением антибиотиков – ванкомицина и ципрофлоксацина. Общая концентрация антибиотиков составляла 3 мг/мл. После пропитки образцы сушили на воздухе до стабилизации массы.

Эксперимент проводили при 37°С, каждый образец помещали в пробирку с 4 мл дистиллированной воды. Смену среды осуществляли через 5, 15, 30, 60 и 120 минут, а также через 24 и 72 часа. По измерению оптической плотности растворов были рассчитаны кумулятивные выходы веществ. Пересчёт проводили по заранее построенным индивидуальным калибровочным графикам.

За основу для сравнения выхода антибиотиков приняли суммарное количество веществ, выделившихся за 3 дня эксперимента.

В первые минуты после помещения образца в воду антибиотики активно поступали в жидкую среду (рис. 9). Уже через 5 минут в раствор перешло 28,4% от общей массы вещества. Дальнейшее высвобождение шло более плавно, через 15 минут выход составил 35,7%, через 30 минут – 38,3%, через 60 минут – 43,3%, а по завершении двух часов – 49,2%.

В последующем скорость высвобождения существенно снижалась: через сутки уровень достиг 80,7%, а спустя трое суток – 100%. Это говорит о многоступенчатом механизме выхода веществ. Сначала происходит быстрое высвобождение с поверхности материала, а затем – более медленное из внутренних слоёв структуры. Такой профиль выхода веществ особенно эффективен при создании покрытий, обеспечивающих быструю начальную концентрацию антибиотиков и её последующее поддержание.

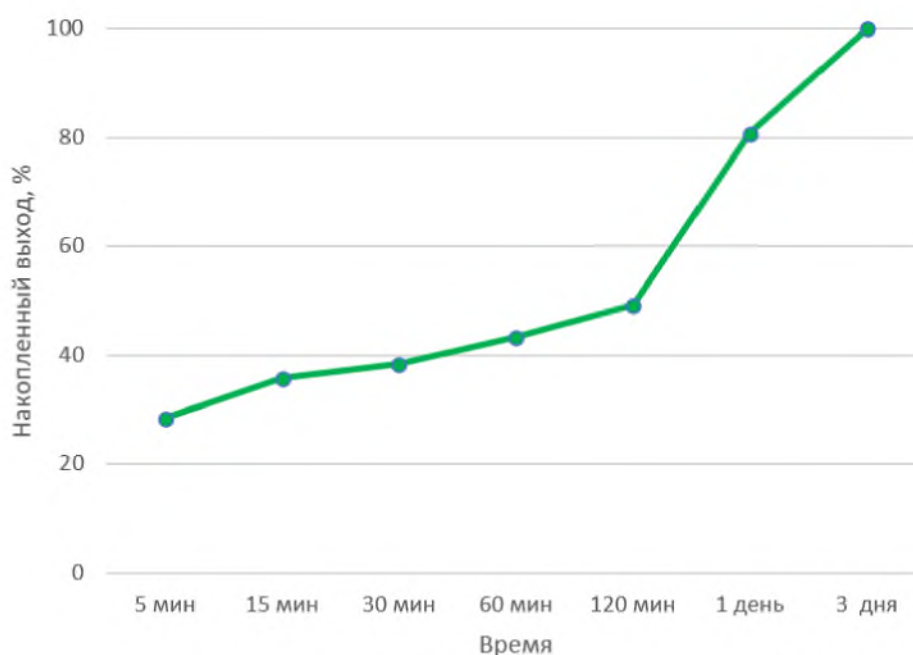


Рисунок 9. Кумулятивный выход ванкомицина и ципрофлоксацина

В рамках эксперимента также оценивалась способность коллагеновой матрицы высвобождать аминокaproновую кислоту в водную среду. За 100%

принято совокупное количество вещества, выделившегося за первые 30 минут эксперимента.

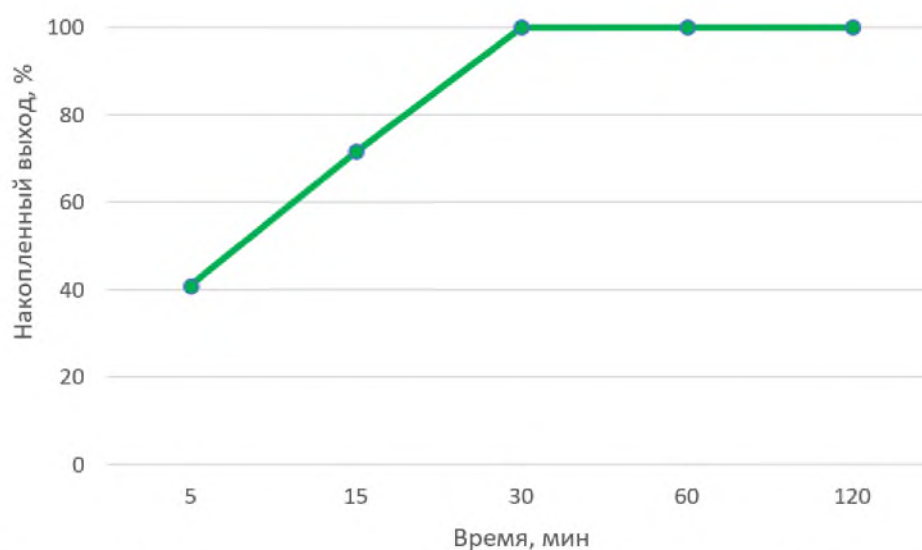


Рисунок 10. Кумулятивный выход аминокaproновой кислоты

Высвобождение аминокaproновой кислоты из коллагеновой матрицы происходило быстро и интенсивно (рис. 10). Уже через 5 минут после помещения образца в водную среду было зафиксировано 40,9% от общего количества вещества. Через 15 минут в раствор переходило 71,6% кислоты от общего зафиксированного объёма. Это говорит о том, что большая часть аминокaproновой кислоты находилась в доступных для диффузии участках матрицы — ближе к поверхности или в пористых каналах, что обеспечивало быстрый начальный выброс вещества.

Такой профиль выхода особенно важен в клиническом применении, поскольку аминокaproновая кислота выступает как антифибринолитик. Быстрое достижение высокой концентрации в зоне действия способствует подавлению распада тромбов, образовавшихся при контакте фибрилл коллагена с тромбоцитами. Действие кислоты может быть решающим на ранних этапах кровопотери.

3.6 Результаты исследования устойчивости биоматериала к окислительному стрессу в условиях *in vitro*

После внедрения биоматериала в ткани организма возможно его воздействие с агрессивной средой, возникающей в ответ на воспалительные процессы. Одним из ключевых механизмов такого ответа служит образование активных форм кислорода, инициируемое, в том числе, ионами железа (Fe^{2+}), высвобождающимися из разрушенных клеток. Для моделирования такого сценария *in vitro* был использован раствор Фентона (pH 7,4), в котором изучалась скорость разрушения экспериментального коллагенового материала. Параллельно для сравнения оценивали резорбцию в нейтральной среде – физиологическом растворе (контроль). Обе серии проб выдерживали в термостате в течение двух недель. После инкубации каждого периода выдержки образцы высушивали до постоянной массы. По разности масс рассчитывали абсолютную и процентную потерю материала.

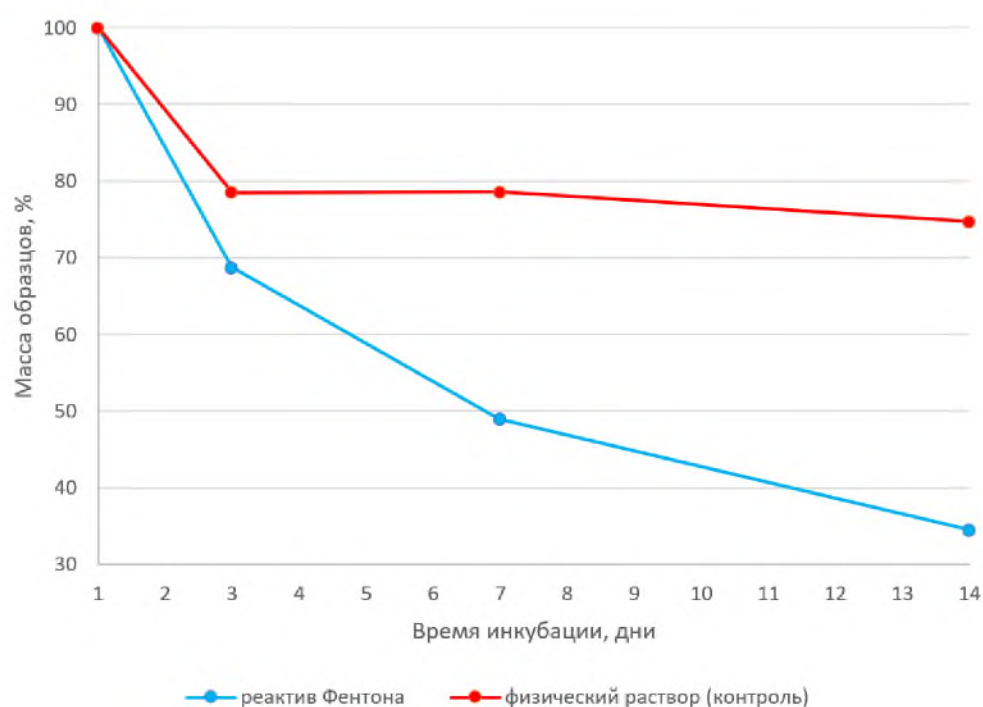


Рисунок 11. Динамика резорбции образцов коллагеновой матрицы

В контрольной среде масса образцов снижалась постепенно и не превышала потерь более 25% от исходной массы в течение двух недель. В то же время, в агрессивных условиях реактива Фентона наблюдалось ускоренное разрушение образцов. Потери массы уже через 3 дня составляли в среднем 31,3%, 51,1% – к 7-му дню и достигали максимума к 14-му дню (65,5%).

Такое поведение биоматериала в реактиве Фентона указывает на его высокую чувствительность к окислительному стрессу, что критически важно при выборе использования, особенно в воспалённой или повреждённой ткани. Быстрая резорбция в условиях моделирования окислительного стресса предполагает быстрое биоразложение при выраженном клеточном ответе *in vivo*.

3.7 Методические рекомендации для школьного проекта по теме «Исследование свойств коллагеновой 3D-матрицы, модифицированной антибиотиками и аминокaproновой кислотой»

Проект направлен на исследование свойств коллагеновой 3D-матрицы, пропитанной раствором антибиотиков и аминокaproновой кислоты. Работа сочетает в себе теоретическую и практическую составляющие, что позволяет учащимся не просто познакомиться с научной тематикой, но и пройти все этапы реального исследования.

1. Подготовительный этап

На этом этапе школьник знакомится с темой и анализирует теоретические материалы. Также формулируются цель, задачи и гипотеза проекта.

На данном этапе учащийся получает задания:

1) изучить теоретические материалы по применению изделий на основе коллагена, антибиотиков и аминокaproновой кислоты при остановке кровотечений;

2) изучить методики спектрофотометрического анализа лекарственных веществ;

3) сформулировать цель, задачи и гипотезу проекта.

Знакомство с методами спектрофотометрии и принципами проведения эксперимента помогает ученику подготовиться к основному блоку исследования. Важно, чтобы учащиеся сами участвовали в формулировании цели, задач и гипотезы. Это способствует развитию у них навыков постановки исследовательских вопросов и критического мышления.

Например:

Цель проекта: изучить свойства коллагеновой 3D-матрицы, модифицированной раствором аминокaproновой кислоты с антибиотиками.

Задачи проекта:

1) провести анализ литературы о применении коллагеновых материалов, аминокaproновой кислоты и антибиотиков в медицине;

2) освоить методику количественного спектрофотометрического анализа лекарств;

3) выполнить модификацию коллагеновой 3D-матрицы раствором антибиотиков и аминокaproновой кислоты;

4) исследовать сорбционные свойства и динамику высвобождения лекарственных веществ из биоматериала.

Гипотеза: модификация коллагеновой 3D-матрицы раствором аминокaproновой кислоты и антибиотиков обеспечивает быстрое высвобождение активных компонентов в жидкую среду, что позволит использовать матрицу для остановки кровотечения и защиты от инфекции.

2. Практический этап

На данном этапе проводится практическая работа с материалами и оборудованием. Основные шаги:

- знакомство с оборудованием (спектрофотометр, кварцевые кюветы, аналитические весы) и принципами его работы;

- подготовка реагентов и материалов (коллагеновая 3D-матрица, аминокaproновая кислота, ванкомицин, ципрофлоксацин);
- приготовление раствора для модификации матрицы с концентрациями: аминокaproновая кислота – 5%, ципрофлоксацин – 0,5 мг/мл, ванкомицин – 2,5 мг/мл;
- выполнение пропитки коллагеновой матрицы подготовленным раствором;
- освоение методики спектрофотометрического анализа и построение калибровочных графиков для количественного определения лекарственных веществ;
- проведение спектрофотометрических измерений для оценки концентраций веществ и динамики высвобождения антибиотиков с аминокaproновой кислотой из матрицы;
- освоение методики для изучения сорбционных характеристик биоматериала;
- оценка сорбционной ёмкости коллагеновой губки.

3. Этап оформления результатов

После завершения эксперимента оформляются результаты. Учащиеся интерпретируют данные, объясняют назначение компонентов, строят графики, анализируют свойства модифицированной матрицы и делают выводы. Завершающим шагом становится оформление и защита проекта.

На данном этапе учащийся получает задания:

- обосновать назначение каждого компонента в составе раствора для модификации матрицы;
- построить графики «Сорбционная ёмкость коллагеновой губки» и «Динамика высвобождения лекарственных веществ из матрицы»;
- сделать выводы о сорбционных свойствах коллагеновой матрицы и динамике высвобождения из неё лекарственных веществ;

- проанализировать данные эксперимента и описать преимущества матрицы, пропитанной лекарственными средствами;
- оформить проект «Исследование свойств коллагеновой 3D-матрицы, модифицированной антибиотиками и аминокaproновой кислотой».

В рамках проекта школьники осваивают современный научный аппарат: изучают принципы действия спектрофотометра, учатся строить калибровочные графики, рассчитывать концентрации веществ, анализировать экспериментальные данные. В процессе работы учащиеся приобретают базовые навыки лабораторной техники, работают с аналитическим оборудованием и учатся оформлять результаты в виде таблиц, графиков и выводов.

Кроме того, проект способствует развитию следующих метапредметных компетенций:

- умение формулировать проблему, гипотезу и цель исследования;
- навыков критического мышления при анализе данных и обосновании выводов;
- способности к самоорганизации и планированию;
- развитие навыков научного изложения – от оформления результатов до их представления при защите проекта;
- формирование ответственного отношения к технике безопасности и аккуратности при работе с оборудованием и реактивами.

Особенностью проекта является междисциплинарность: он объединяет знания из биологии, химии, физики и математики, демонстрируя практическую значимость фундаментальных наук. Благодаря реальному прикладному контексту (исследование гомеостатических и антимикробных материалов), работа вызывает высокий познавательный интерес, а участие в ней формирует у школьника устойчивую учебную мотивацию и научное мышление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была исследована коллагеновая 3D-матрица, модифицированная аминокaproновой кислотой и антибиотиками (ванкомицином и ципрофлоксацином), с целью изучения её физико-химических и функциональных свойств.

Анализ литературных данных показал, что аминокaproновая кислота является ингибитором фибринолиза и применяется для усиления системного и местного гемостаза. Коллаген благодаря своей биосовместимости и способности инициировать свёртывание крови, широко используется как основа для создания гемостатических материалов. Микроструктура коллагена может быть загружена лекарственными препаратами, что позволяет сочетать кровоостанавливающее и антимикробные действие в одной системе.

На первом этапе исследования была адаптирована методика количественного определения аминокaproновой кислоты. После оптимизации условий (рН среды, длина волны, концентрации) удалось получить воспроизводимую и чувствительную методику в диапазоне 30-150 мкг/мл. Полученные параметры ($R^2=0,9952$) подтверждают валидность метода для анализа многокомпонентных систем.

Проведённый анализ УФ-спектров антибиотиков позволил определить характеристическую длину волны: 280 нм как для ванкомицина, так и для ципрофлоксацина. Это обеспечило точное количественное определение их концентраций в растворе.

Сорбционные характеристики коллагеновой матрицы подтверждают её пригодность как носителя лекарств – коэффициент набухания составил 83,4%. Это свидетельствует о пористой структуре и способности удерживать биологически активные вещества.

Аминокапроновая кислота высвобождалась быстро (до 71,6% за 15 минут), что способствует оперативному запуску антифибринолитического эффекта.

Антибиотики высвобождались по двухэтапной схеме: в первые 30 минут в среду переходило до 38,3% вещества – это обеспечивает быстрый антимикробный эффект. Далее шло замедленное высвобождение из внутренних слоёв структуры: 49,2% – за 2 часа, 80,7% – за сутки и 100% – за 72 часа. Такой профиль позволяет поддерживать терапевтическую концентрацию в течение нескольких дней.

Кроме того, биоматериал обладает высокой чувствительностью к окислительному стрессу. В условиях действия реактива Фентона за 14 дней деградировало до 65,5% исходной массы, что важно учитывать при выборе использования, особенно в воспалённой или повреждённой ткани.

В рамках работы также были подготовлены методические рекомендации по выполнению школьного исследовательского проекта. Они включают описание моделей, методик и анализов, доступных для реализации на уровне профильных классов. Таким образом, полученные результаты могут быть адаптированы для образовательных целей в проектной деятельности

Исследуемая модифицированная коллагеновая губка сочетает в себе выраженные гемостатические свойства, способность к локальной доставке лекарственных веществ и биodeградируемость. Это делает её перспективным компонентом для разработки медицинских губок и имплантируемых гемостатиков с противомикробной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барсукова Ю. Н., Мельникова О. А., Мельников М. Ю. Разработка и валидация методики спектрофотометрического определения кислоты аминакапроновой в многокомпонентном гемостатическом средстве // Контроль качества лекарственных средств. 2018. № 1 (22). С. 28-32.
2. Будко Е. В., Черникова Д. А., Ямпольский Л. М., Ящук В. Я. Местные гемостатические средства и пути их совершенствования // Рос. мед. биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2019. № 2. С. 25-30.
3. Венедиктов А. А. Разработка биоматериалов для реконструктивной хирургии на основе ксеноперикардальной ткани: автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 2014. 25 с.
4. Гордиенко М. Г. Сублимационно-высушенная гемостатическая губка с антимикробным (бактерицидным) эффектом и способ её получения: пат. RU 2732156 С2 Российская Федерация. 2020. Бюл. № 26.
5. Григорьян, А.Ю. Средство для лечения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей и слизистых оболочек: пат. RU 2641095 С1 Российская Федерация. 2018. № 2.
6. Истранова Е.В., Абоянц Р.К., Истранов Л.П. Антимикробная активность коллагеновых губок // Фармация. 2011. № 1. С. 34-37
7. Калёнов С. В., Меньшутин Н. В., Пальчикова В. В., Гордиенко М. Г. Сублимационно-высушенная коллагеновая губка с антимикробным и гемостатическим эффектом и способ её получения: пат. WO 2016/076744 A1. Международная публикация заявки РСТ. 19.05.2016.
8. Казайкин В. Н., Пономарев В. О., Вохминцев А. С., Вайнштейн И. А. Определение концентрации ванкомицина в витреальной полости для оптимизации лечения острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов // Практическая медицина. 2016. Т. 1, № 2 (94). С. 85-88.

9. Калинин Р. Е., Сучков И. А., Базаев С. Б., Крылов А. А. Локальные гемостатические средства в хирургической практике // НМП. 2021. № 2. С. 33-38.
10. Липатов В. А., Бордунова М. А., Панов А. А., Денисов А. А. К вопросу классификации местных кровоостанавливающих средств // Innova. 2022. № 4 (29). С. 45-50.
11. Липатов В. А., Коровяковская А. В., Кучина Я. В., Денисов А. А., Панов А. А. Особенности применения кровоостанавливающих средств при миниинвазивных вмешательствах // Innova. 2022. № 3 (28). С. 39-44.
12. Медушевская А. И., Ржеусский С. Э. Анализ ассортимента гемостатических лекарственных средств // Вестник фармации. 2018. № 4 (82). С. 48-52.
13. Мустафин, А.Х. Способ получения комбинированного биоматериала с противоспаечным эффектом: пат. RU 2224549 С1 Российская Федерация. 2004. № 6.
14. Промомед. Транексамовая кислота: раствор для внутривенных инфузий и инъекций // Промомед [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://promomed.ru/catalog/gemostaticheskie-sredstva/traneksamovaya-kislota/> (дата обращения: 10.05.2025).
15. Файзуллин А. Л., Шехтер А. Б., Истранов Л. П., Истранова Е. В., Руденко Т. Г., Гуллер А. Е., Абоянц Р. К., Тимашев П. С., Бутнару Д. В. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха // Сеченовский вестник. 2020. Т. 11, № 1. С. 59-70
16. Aird W. C. Endothelium and hemostasis // In: Aird W. C. (ed.) Endothelial Cells in Health and Disease. New York: Cambridge University Press, 2005. P. 450-463.
17. Alqahtani A., Alqahtani T., Al Fatease A., Tolba E.H. Rapid UV-Vis spectrophotometric method aided by firefly-PLS models for the simultaneous quantification of ciprofloxacin, lomefloxacin, and enrofloxacin in their laboratory

mixture, dosage forms and water samples: greenness and blueness assessment // BMC Chemistry. 2024. Vol. 18, Article No. 172.

18. Baxter Corporation. TISSEEL (Fibrin Sealant, Human): product monograph. Mississauga, ON: Baxter Corporation, 2020. 42 с. Submission Control No: 237432. Date of Initial Approval: June 19, 2020. Date of Revision: October 27, 2020. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.baxter.ca/sites/g/files/ebysai1431/files/2020-11/Tisseel_PM_EN.pdf (дата обращения: 10.01.2025)

19. Bechstein W.O., Strey C. Local and systemic hemostasis in surgery // Chirurg. 2007. Vol. 78, No. 2. P. 95-100.

20. Bouhrour N., Nibbering P.H., Bendali F. Medical Device-Associated Biofilm Infections and Multidrug-Resistant Pathogens // Pathogens. 2024. Vol. 13, No. 5. P. 393.

21. Bouhrour N., Nibbering P.H., Bendali F. Medical Device-Associated Infections Caused by Biofilm-Forming Microbial Pathogens and Controlling Strategies // Antibiotics. 2024. Vol. 13, No. 7. P. 623.

22. Bukatuka C. F., Mbituyimana B., Xiao L., Qaed Ahmed A. A., Qi F., Adhikari M., Shi Z., Yang G. Recent Trends in the Application of Cellulose-Based Hemostatic and Wound Healing Dressings // Journal of Functional Biomaterials. 2025. Vol. 16, No. 5. P. 151.

23. Chapin J. C., Hajjar K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation // Blood Reviews. 2015. Vol. 29. P. 17-24.

24. Cheng Y., Yang Q., Wang J., Hu Z., Li C., Zhong S., Huang N. Optimization Preparation and Evaluation of Chitosan Grafted Norfloxacin as a Hemostatic Sponge // Polymers. 2023. Vol. 15, No. 3. P. 672.

25. Costerton J. W., Montanaro L., Arciola C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation // International Journal of Artificial Organs. 2005. Vol. 28, No. 11. P. 1062-1068.

26. Dietrich W., Spannagl M., Berger S., Braun S.L., Boehm D.H., Schmitt D.V., Lange R. Tranexamic acid and aprotinin in primary cardiac operations // The Annals of Thoracic Surgery. 2008. Vol. 86, No. 5. P. 1550-1557.
27. DrugBank. Hemostatics // DrugBank Online [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://go.drugbank.com/categories/DBCAT000115> (дата обращения: 20.04.2025).
28. Du J., Wang J., Xu T., Yao H., Yu L., Huang D. Hemostasis Strategies and Recent Advances in Nanomaterials for Hemostasis // Molecules. 2023. Vol. 28, No. 13. P. 5264.
29. Eissa R. A., Saafan H. A., Ali A. E., Ibrahim K. M., Eissa N. G., Hamad M. A., Pang C., Guo H., Gao H., Elsabahy M., et al. Design of nanoconstructs that exhibit enhanced hemostatic efficiency and bioabsorbability // Nanoscale. 2022. Vol. 14. P. 10738-10749.
30. Ethicon. SURGICEL™ Family of Absorbable Hemostats: Product Information Sheet. Ethicon, Johnson & Johnson Surgical Technologies, 2021. 4 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.jnjmedtech.com/system/files/pdf/SURGICEL-Family-Comparison-Table_0.pdf (дата обращения: 5.02.2025).
31. Greilich P. E., Jessen M. E., Satyanarayana N., Whitten C. W., Nuttall G. A., Beckham J. M., Wall M. H., Butterworth J. F. The effect of epsilon-aminocaproic acid and aprotinin on fibrinolysis and blood loss in patients undergoing primary, isolated coronary artery bypass surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled, noninferiority trial // Anesthesia & Analgesia. 2009. Vol. 109, No. 1. P. 15-24.
32. Griffin J.H. Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII) // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1978. Vol. 75, No. 4. P. 1998-2002.

33. 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. Vol. 16, No. 8. P. 273.
34. Hwang J., Huang H., Sullivan M.O., Kiick K.L. Controlled Delivery of Vancomycin from Collagen-tethered Peptide Vehicles for the Treatment of Wound Infections // *Molecular Pharmaceutics*. 2023. Vol. 20, No. 3. P. 1696-1708.
35. Jahan N., Ibne Mahbub M.S., Lee B.-T., Bae S.H. A Paintable Small-Molecule Hydrogel with Antimicrobial and ROS Scavenging Activities for Burn Wound Healing // *Gels*. 2024. Vol. 10, No. 10. P. 621.
36. Jahan N., Ibne Mahbub M.S., Lee B.-T., Bae S.H. In Vivo and In Vitro Investigation of a Novel Gelatin/Sodium Polyacrylate Composite Hemostatic Sponge for Topical Bleeding // *Journal of Functional Biomaterials*. 2023. Vol. 14, No. 5. P. 265.
37. Kaseer H., Sanghavi D.K. Aminocaproic Acid // *StatPearls [Электронный ресурс]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554475/> (дата обращения: 2.03.2025).
38. Katrilaka C., Karipidou N., Petrou N., Manglaris C., Katrilakas G., Tzavellas A.N., Pitou M., Tsiridis E.E., Choli-Papadopoulou T., Aggeli A. Freeze-Drying Process for the Fabrication of Collagen-Based Sponges as Medical Devices in Biomedical Engineering // *Materials*. 2023. Vol. 16, No. 12. P. 4425.
39. Klein M., Zaupa C., Eglin D., Alini M., Richards R.G., Moriarty T.F. Effects on Tissue Integration of Collagen Scaffolds Used for Local Delivery of Gentamicin in a Rat Mandible Defect Model // *Bioengineering*. 2022. Vol. 9, No. 7. P. 275.
40. Lazarevic M., Petrovic S., Pierfelice T.V., Ignjatovic N., Piattelli A., Vlajic Tovilovic T., Radunovic M. Antimicrobial and Osteogenic Effects of Collagen Membrane Decorated with Chitosan–Nano-Hydroxyapatite // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, No. 4. P. 579.

41. Malik A., Zietak M., Kozlowski M., Beekmann U., Cholewa-Kowalska K., Bajor G., Trzaskowski B. Hemostatic strategies for uncontrolled bleeding: A comprehensive update // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2021. Vol. 109, No. 10. P. 1465-1477.
42. Negut I., Albu C., Bitu B. Advances in Antimicrobial Coatings for Preventing Infections of Head-Related Implantable Medical Devices // *Coatings*. 2024. Vol. 14, No. 3. P. 256.
43. Pharmacia & Upjohn Company. Gelfoam® absorbable gelatin compressed sponge, USP: product information. New York: Division of Pfizer Inc., 2012. 7 с. LAB-0306-4.0. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/uspi_gelfoam_plus.pdf (дата обращения: 5.02.2025)
44. Pietrocola G., Campoccia D., Motta C., Montanaro L., Arciola C. R., Speziale P. Colonization and Infection of Indwelling Medical Devices by *Staphylococcus aureus* with an Emphasis on Orthopedic Implants // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, No. 11. P. 5958.
45. Rancan F., Contardi M., Jurisch J., Blume-Peytavi U., Vogt A., Bayer I. S., Schaudinn C. Evaluation of drug delivery and efficacy of ciprofloxacin-loaded povidone foils and nanofiber mats in a wound-infection model based on ex vivo human skin // *Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, No. 10. P. 527.
46. Pozzolini M., Scarfi S., Gallus L., Castellano M., Vicini S., Cortese K., Gagliani M.C., Bertolino M., Costa G., Giovine M. Production, Characterization and Biocompatibility Evaluation of Collagen Membranes Derived from Marine Sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847 // *Marine Drugs*. 2018. Vol. 16, No. 4. P. 111.
47. Roshkovan L., Singhal S., Katz S.I., Galperin-Aizenberg M. Multimodality imaging of Surgicel®, an important mimic of post-operative complication in the thorax // *BJR Open*. 2021. Vol. 3, No. 1. P. 20210031.
48. Sharma S., Mohler J., Mahajan S.D., Schwartz S.A., Bruggemann L., Aalinker R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic

Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment // Microorganisms. 2023. Vol. 11, No. 6. P. 1614.

49. Smith S. A., Travers R. J., Morrissey J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2015. Vol. 50. P. 326-336.

50. Sun L., Shen Y., Li M., Wang Q., Li R., Gong S. Comprehensive Assessment of Collagen/Sodium Alginate-Based Sponges as Hemostatic Dressings // Molecules. 2024. Vol. 29, No. 13. P. 2999.

51. TISSEEL (Fibrin Sealant): product information // Baxter [Electronic resource]. Available at: <https://www.baxter.com/healthcare-professionals/surgical-care/tisseel-fibrin-sealant> (дата обращения: 20.01.2025).

52. Zhao Y., Li Y., Wang Y., Zhang X., Liu J., Wang J., Sun M. Characterization and Analysis of Chitosan-Gelatin Composite-Based Biomaterial Effectivity as Local Hemostatic Agent: A Systematic Review // Polymers. 2023. Vol. 15, No. 3. P. 575.