

К. В. Апрытина*, А. С. Корягин, О. Н. Смирнова, Л. А. Смирнова

ГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, КОМПЛЕКСНОСВЯЗАННОГО С ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ

ФГАОУ ВО “Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского”, Россия, 603950, Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23.
* e-mail: apryatina_kv@mail.ru

Рассматривается получение новых, эффективных гемостатических материалов на основе полимерной композиции из модифицированного хитозана, имеющего трехмерную сшитую структуру в качестве полимерной матрицы и координированных на ней ионов кальция. Установлена оптимальная концентрация ионов кальция в композиции с хитозаном, составляющая 10 – 20 ммоль/л, которая обеспечивает эффективное время свертывания крови *in vitro* — 40 с. Показано, что, наряду с сукцинатом и хлоридом хитозана, эффективным кровоостанавливающим действием обладают также композиции хитозана в растворах с никотиновой кислотой. При использовании различных солей кальция статистических различий по их влиянию на время свертывания крови выявлено не было. В опытах *in vivo* показано, что композиция на основе хитозана эффективна при остановке кровотечений любой степени тяжести — как при наружных, так и при внутренних повреждениях тканей.

Ключевые слова: гемостатическая композиция; ранозаживление; хитозан; ионы кальция.

В настоящее время хитозан (ХТЗ, поли((1,4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкоза)) находит все большее применение в различных областях биотехнологии, медицины и промышленности. Это связано в первую очередь с доступностью и возобновляемостью сырьевых источников, а также уникальными свойствами, которые присущи этому полисахариду — биоразлагаемость, биосовместимость, нетоксичность, бактерицидность [1].

Одним из перспективных направлений использования ХТЗ является разработка композиций, обладающих комплексным действием, включающим экспрессную остановку крови, ранозаживление, высокую конгруэнтность материала к раневой и ожоговой поверхности, в связи с остро стоящей проблемой травматичности в результате чрезвычайных ситуаций, при производственных и бытовых травмах. За последние два десятилетия достигнут прогресс в разработке нового поколения узконаправленных местных гемостатических агентов – Quick-clot® (Z-Medica Corporation, США), QuikClotCombat Gauze® (Z-Medica Corporation, США), Celox™ (MedTrade Products Ltd, Великобритания), “Гемофлекс® Комбат” (ООО “Инмед”, Россия). Тем не менее эти средства имеют ряд недостатков. В состав большинства из них входят порошкообразные цеолит, смектит или каолин — минералы, известные своими абсорбирующими свойствами. При их нанесении существует риск возникновения болезненных ощущений, вследствие локального разогрева и раздражения раны при соприкосновении с грубыми мелкодисперсными компонентами. Все эти средства не обладают дополнительным регенеративным эффектом, не являются биоразлагаемыми и требуют удаления из раны. Таким образом, разработка быстрого и надежно-

го способа, обеспечивающего ускоренное свертывание крови и последующее надежное заживление ран, является одним из возможных путей снижения негативных последствий травматизма [2, 3].

Целью работы являлось получение и исследование свойств композиций трехмерной структуры на основе ХТЗ, комплексно связанного с ионами кальция, обладающих эффективным гемостатическим действием и ранозаживляющим эффектом.

Экспериментальная химическая часть

В работе использовали высокоочищенный кислото-растворимый ХТЗ производства ООО “Биопрогресс” (Россия) с молекулярной массой (ММ) = 1,1 · 10⁵, степенью деацетилирования (СД) = 80 %. Массовая доля минеральных веществ в ХТЗ не превышала 0,5 %, влаги — 6 %, нерастворимых веществ — 0,1 %. Использовали соляную, янтарную, никотиновую, аскорбиновую кислоты марки х.ч. производства АО “Химреактив”, глюконат и глицерофосфат кальция производства “Sigma-Aldrich” (Германия), хлорид кальция производства АО “Химреактив”. Приготовление растворов ХТЗ (3 масс. %) осуществляли растворением навески сухого полимера (± 0,0002 г) в водных растворах соляной (0,5 масс. %), янтарной (2 масс. %), никотиновой (1 масс. %), аскорбиновой (2 масс. %) кислот. Растворение проводилось на магнитной мешалке ULAB US-1500D при скорости вращения 500 об/мин и T = 24 °С. Для получения гемостатической композиции через 22 ч в раствор вводили соль кальция необходимой концентрации (± 0,0002 г), растворение соли проводилось на магнитной мешалке при скорости вращения 700 об/мин и T = 45 °С.

Изучение образования комплексов ХТЗ- Ca^{2+} проводили методом ИК-спектроскопии [4] (спектрофотометр “Perkin-Elmer”, США). ХТЗ, комплексносвязанный с ионами кальция, осаждали из раствора спиртовым раствором NaOH. Осадок многократно промывали водой до нейтральной pH среды и сушили до постоянной массы в вакуумном шкафу при 30 °С. Исходный материал для анализа готовился способом прессования таблеток с КВг гидравлическим ручным прессом. В качестве иммерсионной среды использовали бромид калия квалификации о.с.ч. Регистрировали спектры пропускания образцов в интервале частот 550 – 4000 см^{-1} .

Размер комплексов полимер-ион в сверхразбавленных растворах ХТЗ определяли методом динамического рассеяния света (DLS) [5] на анализаторе размеров частиц и дзета-потенциала NanoBrook Omni (“Brookhaven Instruments Corporation”, США). В данном методе определяется коэффициент диффузии частиц дисперсной фазы в жидкости на основании анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Размер сферических невзаимодействующих между собой частиц рассчитывается в программе на основе формулы Стокса — Эйнштейна. Динамическую вязкость растворов для метода измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II+ Pro.

Экспериментальная биологическая часть

Испытания гемостатической композиции в опытах *in vitro*. Для опытов готовили водные растворы ХТЗ 3 масс. % в различных кислотах с концентрациями ионов кальция от 5 до 100 ммоль/л. Для исследований брали кровь самок нелинейных крыс массой 250 – 300 г. Общее время свертывания цельной крови при добавлении в нее растворов ХТЗ исследовали на гемокоагулографе N-331 по известной методике [6]. У экспериментальных животных отбирали несколько капель крови из подъязычной вены в кювету и приливали 100 мкл исследуемого раствора ХТЗ, далее снимали показания прибора. Параллельно проводили контрольные опыты по влиянию на свертываемость крови индивидуальных компонентов.

Испытания гемостатической композиции в опытах *in vivo*. Исследование кровоостанавливающих свойств различных композиций ХТЗ, содержащих ионы кальция, в опытах *in vivo* проводили на предварительно наркотизированных лабораторных животных — нелинейных белых крысах массой ~ 250 – 300 г. В качестве наркоза использовали диэтиловый эфир. Во всех опытах применялась следующая методика эксперимента. Испытание гемостатических композиций каждого состава выполнялось на 5 наркотизированных животных. У крысы препарировали кожный лоскут с левого бедра размером ~ 2 × 2 см, обнажая бедренные вены и артерию, надрезали их скальпелем. Сразу после начала кровотечения на рану

наносили композицию и по секундомеру засекали время до полной его остановки (образования тромба).

Оценка специфической фармакологической активности гемостатической композиции. Испытания по оценке специфической фармакологической активности композиции проводили в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7] на кроликах под тиопенталовым наркозом. Число испытаний $n = 5$. Выполняли лапаротомию с использованием продольного разреза по белой линии живота. Произвели резекцию выступившей части печени лезвием. В качестве контроля использовали тампон из марлевых салфеток, в качестве сравнения использовали гемостатическое средство — аминокaproоновую кислоту (5 % раствор для инфузий, производитель ОАО “ДАЛЬХИМФАРМ”, № Р N003799/01 в Государственном реестре лекарственных средств). Аминокaproоновая кислота — это лекарственное средство, входящее в группу гемостатиков. В хирургической практике применяется для остановки кровотечений во время проведения различных оперативных вмешательств, включая женские гинекологические операции, а также внутривисцеральные, нейрохирургические, урологические, торакальные и другие. Остановку капиллярно-паренхиматозного кровотечения выполнили с помощью нанесения средства на марлевую салфетку, производилась тампонада раны печени (моделирование манипуляции тампонирования раны печени в рамках тактики многоэтапного хирургического лечения при тяжелой сочетанной травме). Время остановки кровотечения определяли по секундомеру. Критерием оценки момента остановки кровотечения стало полное отсутствие проникновения крови через поверхность и края применяемого гемостатика.

Все результаты биологических исследований статистически обрабатывали с помощью программы BIOSTAT. Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного анализа, *t*-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Крускала — Уоллиса [8]. При сравнении более чем 2 выборок применяли поправку Бонферрони.

Результаты и их обсуждение

Разработка биосовместимой гемостатической композиции на основе ХТЗ базировалась на анализе процесса остановки кровотечений при нарушении целостности сосудистых стенок кровеносной системы в организме [9], а также на свойствах самого полимера — поликатионной природы, мукоадгезивности, способности связываться с отрицательно заряженными тромбоцитами и эритроцитами. Обоснованием использования ХТЗ как возможной матрицы — аналога клеточных мембран — в процессе свертывания крови, служит анализ работ, в которых доказано образование полимерного комплекса между белками и полисахаридом, обусловленное электростатическими, Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями и водородными связями [10, 11]. Образование полимерных комплексов

белков — факторов свертывания — с ХТЗ позволит уменьшить время гемостаза за счет увеличения площади матричной активной поверхности, необходимой для протекания реакций гемостаза.

Взаимодействие ХТЗ с ионами кальция. Благодаря высоким хелатообразующим свойствам ХТЗ [12] этот полисахарид способен образовывать комплексы с ионами кальция, являющимися активными участниками процесса тромбообразования в организме. Образование комплекса подтверждается методами ИК-спектроскопии и DLS.

ИК-спектры ХТЗ показали смещение полос полисахарида с 1165 до 1149 см⁻¹, соответствующее валентным колебаниям групп С-О-С. Полосы в области 1504 и 1635 см⁻¹, соответствующие деформационным колебаниям аминогрупп ХТЗ, смещаются в область меньших длин волн на 8 см⁻¹ соответственно. Вследствие этого можно полагать, что главными активными центрами комплексообразования с ионами кальция в ХТЗ являются аминогруппы полисахарида.

Кроме того, исследование методом DLS композиции показало уменьшение среднего эффективного диаметра частиц ХТЗ, комплексно связанного с ионами кальция (табл. 1).

Средний эффективный диаметр частиц ХТЗ после комплексообразования сжимается ~ на 30 % против исходного состояния, независимо от концентрации ионов кальция в композиции.

Таким образом, в гемостатической композиции, представляющей собой готовую кальций-содержащую матрицу, возрастает количество активных центров связывания факторов свертывания крови, существенно уменьшая время остановки кровотечений.

Кровоостанавливающие композиции в опытах *in vitro* и *in vivo*. Изучение кровоостанавливающих свойств композиций проводили с использованием экспериментальных животных (белых крыс). В опытах *in vitro* исследовано влияние концентрации ионов кальция в композиции на общее время свертывания крови (табл. 2).

Как видно из данных, представленных в табл. 2, при достижении значений концентрации ионов кальция в композиции ~ 10 – 20 ммоль/л, время свертывания крови понижается почти в 4 раза относительно контроля (156 с) и при дальнейшем увеличении концентрации остается практически неизменным. Таким образом, установлена оптимальная концентрация ио-

Таблица 1
Эффективный диаметр макромолекул хитозана и хитозана, комплексно связанного с ионами кальция

| Образец | Солевая форма хитозана | + 20 ммоль/л Ca ²⁺ | + 100 ммоль/л Ca ²⁺ |
|-------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Эффективный диаметр, нм | 162,3 ± 11,5 | 108,5 ± 8,4 | 104,9 ± 9,1 |

нов кальция в композиции, составляющая 10 – 20 ммоль/л, которая обеспечивает эффективное время свертывания крови *in vitro* — 40 с.

В исследовании кровоостанавливающих свойств различных композиций ХТЗ, содержащих ионы кальция, в опытах *in vivo* концентрацию ионов кальция в составе увеличили до 50 и 100 ммоль/л из-за сильного разбавления композиции током крови и ее частичным смыванием (табл. 3). Среднее время остановки венозного и артериального кровотока в контрольной группе животных составило ~ 130 с.

Эксперименты *in vivo* показали, что, наряду с сукцинатом и хлоридом ХТЗ, эффективным кровоостанавливающим действием обладают также композиции ХТЗ в растворах с никотиновой кислотой (табл. 3). При использовании различных солей кальция статистических различий по их влиянию на время свертывания крови выявлено не было.

При этом следует отметить, что композицией достигается полное закрытие раны с последующим формированием на ее поверхности воздухопроницаемой пленки, фактически выполняющей роль искусственной кожи. В процессе заживления происходит разрушение пленки под действием тканевых гидролитических ферментов до образования олиго-, ди- и моносахаридов, выступающих в роли пластического и энергетического материала при эпителизации раневой поверхности.

Кроме того, для уменьшения эффекта “смывания” током крови гемостатического средства в форме раствора, на основе базового состава была разработана и апробирована композиция в виде геля трехмерной структуры. Гель получали, используя в качестве сшивающего агента глутаровый альдегид (ГА), при мольном соотношении ХТЗ:ГА 1:0,1 – 1:0,2 осново-моль/моль. Формирование трехмерной структуры происходит при взаимодействии аминогруппы ХТЗ и альдегидной группы сшивающего агента.

Таблица 2
Общее время свертываемости крови при различных концентрациях ионов кальция в 3 масс. % растворе хитозана в опытах *in vitro*

| Время, с | [Ca ²⁺], ммоль/л | | | | | | |
|--|------------------------------|--------------|---------------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------|
| | 0 | 0,5 | 2 | 5 | 10 | 100 | 100 (в отсутствие хитозана) |
| <i>t</i> (<i>n</i> = 5, <i>M</i> ± <i>k</i>) | 156,3 ± 15,1 | 137,5 ± 22,4 | 100,5 ± 14,9* | 60,7 ± 8,9* | 40,6 ± 7,2* | 43,4 ± 10,5* | 149,4 ± 18,5* |

Здесь и далее: *n* — число испытаний, *M* — среднее значение, *k* — доверительный интервал;
* различия достоверны по сравнению с контролем (*p* < 0,05).

Таблица 3
Время свертывания крови $t_{св.}$ в опытах *in vivo* при использовании некоторых кровоостанавливающих композиций на основе хитозана (3 масс. %) в водных растворах различных кислот, содержащих ионы кальция

| Композиции на основе 3 масс. % хитозана | $t_{св.}, с (M \pm k, n = 5)$ |
|--|-------------------------------|
| Контроль | 130,2 ± 29,1 |
| Янтарная кислота + 100 ммоль/л хлорида кальция | 40,6 ± 9,4 * |
| Соляная кислота + 100 ммоль/л хлорида кальция | 37,3 ± 6,7 * |
| Никотиновая кислота + 100 ммоль/л хлорида кальция | 42,8 ± 7,5 * |
| Аскорбиновая кислота + 100 ммоль/л хлорида кальция | 71,9 ± 12,8 * |
| Никотиновая кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция | 40,2 ± 9,9* |
| Гель: Никотиновая кислота + 50 ммоль/л глюконата кальция | 35,4 ± 10,5* |
| Гель: Янтарная кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция | 30,9 ± 10,3* |
| Гель: Янтарная кислота + 50 ммоль/л хлорида кальция | 39,5 ± 9,7* |
| Гель: Янтарная кислота + 50 ммоль/л глюконата кальция | 38,8 ± 7,2* |
| Водный раствор 100 ммоль/л хлорида кальция | 123,6 ± 15,1* |

* Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 4
Время свертывания крови при тампонировании раны печени кролика образцом, нанесенным на марлевый тампон

| Образец | $t_{св.}, с (M \pm k, n = 5)$ |
|---|-------------------------------|
| Контроль | 210 ± 31,4* |
| Аминокапроновая кислота | 121 ± 7,8* |
| Кровоостанавливающий гель на основе 3 масс.% сукцината хитозана, содержащий 50 ммоль/л глицерофосфата кальция | 29 ± 4,2*:# |

* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

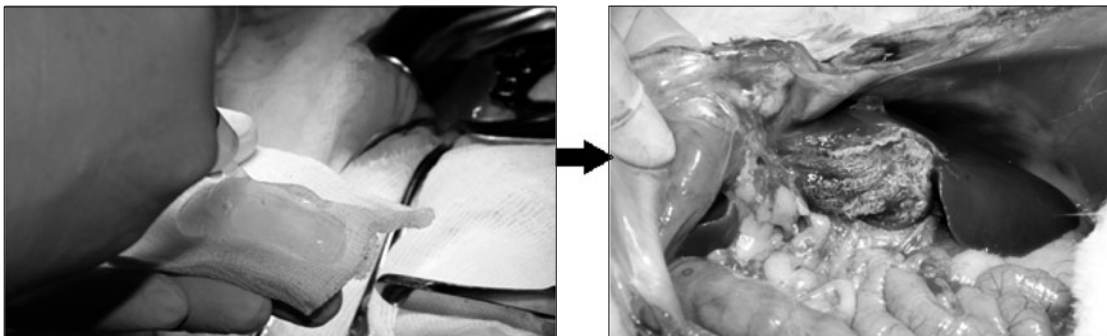
Гели не смываются током крови с поверхности раны, вследствие чего время остановки кровотечения сокращается с 40 с до 30 с в сравнении с растворами (табл. 3). Динамику изменений свойств геля контролировали в течение года. Изменений в ИК-спектрах не наблюдалось. Вязкость после 10 мес хранения образцов падает на 10 %.

Провели оценку специфической фармакологической активности полученного геля в сравнении с гемостатическим средством — аминокапроновой кислотой. Время остановки кровотечения при использовании кровоостанавливающего геля (рисунок)

Таблица 5
Влияние подкожного и внутримышечного введения композиции (25 мг/кг) на биохимические показатели своротки крови ($M \pm SEM, n = 5$)

| Время наблюдения | Группа животных | | |
|------------------|---------------------------|----------------------------|---------------|
| | контроль | гемостатическая композиция | |
| | | подкожно | внутримышечно |
| 14 дней | 72,73 ± 1,26 | Белок общий, г/л | 63,31 ± 4,27* |
| | | 52,34 ± 6,90* | |
| | 41,19 ± 0,99 | Альбумин, г/л | 35,53 ± 1,10* |
| | | 32,02 ± 4,33* | |
| | 174,43 ± 0,92 | Креатинин, мкмоль/л | 175,51 ± 2,30 |
| | | 172,07 ± 2,33 | |
| | 1,31 ± 0,15 | Холестерин общий, ммоль/л | 0,85 ± 0,07* |
| | | 0,74 ± 0,05* | |
| | 97,66 ± 9,72 | АсАТ, Е/л | 119,74 ± 6,96 |
| | | 149,18 ± 15,61 | |
| | 74,91 ± 8,28 | АлАТ, Е/л | 93,94 ± 2,43 |
| | | 95,85 ± 14,70 | |
| | 6,55 ± 0,33 | Глюкоза, ммоль/л | 6,76 ± 0,15 |
| | | 6,80 ± 0,24 | |
| 4,06 ± 0,10 | Билирубин общий, мкмоль/л | 3,49 ± 0,54 | |
| | 3,61 ± 0,25 | | |
| 6,80 ± 0,118 | Калий, ммоль/л | 6,62 ± 0,259 | |
| | 5,69 ± 0,700 | | |
| 2,40 ± 0,147 | Кальций, ммоль/л | 2,31 ± 0,264 | |
| | 1,69 ± 0,392 | | |
| 142,82 ± 1,48 | Натрий, ммоль/л | 142,97 ± 1,28 | |
| | 143,11 ± 1,16 | | |
| 1,18 ± 0,081 | Триглицериды, ммоль/л | 0,47 ± 0,056* | |
| | 0,38 ± 0,091* | | |

* Различия достоверны по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, критерий Манна — Уитни).



Тампонада раны печени разработанным кровоостанавливающим гелем.

достоверно ниже, чем у аминокaproновой кислоты и контроля (табл. 4).

Доклинические исследования образцов гемостатического геля. Гемостатический гель различных составов был предоставлен для официальных доклинических испытаний в Нижегородскую государственную медицинскую академию, в ходе которых было изучено токсическое действие препарата, а также рекомендованные ГОСТ показатели биохимического состава крови животных. Испытания проводили в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7]. Кровоостанавливающую композицию вводили как подкожно, так и внутримышечно инъекционно, и дополнительно перорально.

Изучение биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных не выявило изменений большинства показателей, наблюдалось достоверное уменьшение содержания общего белка, альбумина, холестерина и триглицеридов в опытных группах по сравнению с контрольной (табл. 5).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 4.3760.2017/ПЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. К. Г. Скрябин и др. (ред.), *Хитозан*, сб. ст., Центр “Биоинженерия”, Москва (2013).
2. F. Su, Y. Wang, X. Liu, et al., *J. Biomaterials Sci., Polymer Edition*, **29**(13), 1515 – 1528 (2018).
3. V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **97**(Pt B), 417 – 426 (2015).
4. Б. Н. Тарасевич, *Основы ИК спектроскопии с преобразованием Фурье. Подготовка проб в ИК спектроскопии*, МГУ, Москва (2012).
5. К. Г. Куликов, Т. В. Кошлан, *Ж. технич. физики*, **85**(12), 26 – 32 (2015).
6. В. В. Меньшиков (ред.), *Лабораторные методы исследования в клинике*, Медицина, Москва (1987).
7. А. Н. Миронов, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К, Москва (2012).
8. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, пер. с англ., Практика, Москва (1998).
9. R. Gazzeri, M. Galarza, G. Callovini, et al., *Surg. Technol. Int.*, **30**, 468 – 476 (2017).
10. A. Zubareva, A. Plyina, A. Prokhorov, *Molecules*, **18**, 7848 – 7864 (2013).
11. E. J. Bealer, S. Onissema-Karimu, A. Rivera-Galletti, et al., *Polymers (Basel)*, **12**(2), 464 (2020).
12. Z. Li, Y. Du, Z. Zhang, et al., *React. Funct. Polym.*, **55**, 35 (2003).

Поступила 04.01.19

HEMOSTATIC COMPOSITIONS BASED ON CHITOSAN COMPLEXES WITH CALCIUM IONS

K. V. Apryatina^{1*}, A. S. Koryagin¹, O. N. Smirnova¹, and L. A. Smirnova¹

¹ N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

* e-mail: apryatina_kv@mail.ru

The issue of creating universal materials with rapid hemostatic effect in venous and arterial bleeding and effective wound healing is topical because of the acute problem of treating traumas caused by emergencies. This article addresses the creation of new effective hemostatic materials based on polymer compositions of modified chitosan, having a three-dimensional cross-linked structure as a polymer matrix, and coordinated calcium ions. In addition to chitosan succinate and chloride, effective blood coagulating action was observed for chitosan compositions with nicotinic acid. Various calcium salts were equally effective in respect of the coagulation time. Experiments *in vitro* showed that the optimum concentration of calcium ions in chitosan-based composition was 10 – 20 mmol/L that ensured rapid blood coagulation and was effective in stopping bleeding of any degree of severity, both with external and internal injuries of tissues and organs in a shortest possible time within 40 sec and exhibited wound-healing properties.

Keywords: hemostatic composition; chitosan; calcium ions; wound healing.