

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕСТНЫХ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА НА ИХ ГЕМОСТАТИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

О. В. Кадысева^{1,3}, В. Н. Быков², О. Ю. Стрелова¹, В. Ф. Таранченко³, А. Н. Гребенюк^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

³ ООО «Специальная и Медицинская Техника»

Поступила в редакцию 01.06.2020 г.

Аннотация. Местные гемостатические средства (МГС) на основе хитозана получили широкое распространение для остановки массивных артериальных и венозных кровотечений в ходе вооруженных конфликтов и в медицине катастроф, а также находят все большее применение в гражданском здравоохранении. Однако, не существует единого мнения относительно физико-химических показателей, определяющих гемостатические свойства хитозана. До настоящего времени наиболее надежным методом подтверждения кровоостанавливающей активности МГС на основе хитозана остаются эксперименты *in vitro* и *in vivo*, предполагающие моделирование массивного кровотечения на крупных животных. Кроме того, отсутствуют стандартные подходы к контролю качества хитозанового сырья и медицинских изделий, полученных на его основе. Цель данного исследования состояла в определении дополнительных физико-химических характеристик, которые в перспективе позволят сделать прогноз гемостатической активности МГС на основе хитозана без проведения биологического эксперимента.

В ходе проведенных исследований было рассмотрено влияние физико-химических свойств на эффективность МГС на основе хитозана в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) установлено, что снижение гемостатической активности МГС может сопровождаться изменением химической структуры при длительном хранении или влиянием концентрации хитозана (низкой интенсивностью сигналов протонов в ЯМР спектре). С использованием метода спектрофотометрии выявлена закономерность между проявлением гемостатической активности и конформационным состоянием макромолекул хитозана. Показано, что в качестве дополнительного критерия, свидетельствующего о способности хитозана инициировать гемостаз, можно рассматривать рН конформационного перехода «спираль-глобула». Гемостатическая активность МГС на основе хитозана более активно проявляется в конформации «глобула». Наибольшая эффективность в эксперименте была выявлена для образцов МГС, у которых при значениях рН раствора, близких к физиологическим, отмечался переход значительной части молекул из состояния «спираль» в состояние «глобула», что сопровождалось скачкообразным изменением светопропускания раствора. Данные полностью согласуются с результатами экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: хитозан, кровотечение, гемостаз, степень деацетилирования, конформация, ЯМР, спектрофотометрия.

Массивное наружное кровотечение остается одной из основных причин смерти на догоспитальном этапе как в военной, так и в гражданской медицине. К настоящему моменту разработано множество средств и способов временной оста-

новки наружных кровотечений. Наряду со жгутами, турникетами и давящими повязками, все большее распространение получают местные гемостатические средства (МГС), предназначенные как для самостоятельной остановки кровотечения, так и для применения в комплексе с другими способами гемостаза [1].

Среди МГС особое внимание привлекают изделия на основе хитозана. Но, несмотря на растущий опыт их практического применения, не существует единого мнения относительно механизма, обеспечивающего гемостатический эффект хитозана, а также понимания физико-химических свойств этого биополимера, определяющих его способность останавливать кровотечение [2-5]. Как следствие, отсутствуют единые подходы и стандарты контроля качества сырья хитозана и готовых МГС, полученных на его основе.

Основными показателями при контроле качества сырья хитозана как правило служат степень деацетилирования (ДА), вязкость, влажность, микробиологическая чистота, содержание тяжелых металлов и пестицидов, гранулометрический состав (СанПиН 2.3.2.1078-01, СанПиН 2.3.2.1290-03. V, VI) [6], однако, ни один из приведенных показателей, как и оценка гемостатической активности *in vitro*, не имеет решающего значения при определении его способности инициировать гемостаз. Наиболее надежным тестом, свидетельствующим об эффективности МГС, по-прежнему остается проведение эксперимента на крупных животных.

Цель исследования состояла в определении дополнительных физико-химических характеристик, которые в перспективе позволят сделать вывод о гемостатической активности МГС на основе хитозана без проведения экспериментов *in vitro* с использованием образцов цельной крови и без испытаний *in vivo*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования были использованы образцы МГС на основе хитозана: «Celox. Гемостатические гранулы» (MedTrade Products Ltd., Великобритания); «Средство гемостатическое стерильное Гепоглос в гранулах» (ООО «Люми», Россия); гемостатическое средство в гранулах (ООО «Специальная и Медицинская Техника», Россия) [7] – «Образец №1» и «Образец №2». Оставшийся на момент испытаний срок годности «Образца №1» составлял более половины от определенного разработчиком, в то время как «Образец №2», аналогичный по составу с «Образцом №1», был подвергнут испытаниям стабильности методом «ускоренного старения», эквивалентно 5 годам хранения для оценки стабильности его свойств в данном временном интервале с целью установления срока годности [8]; средство перевязочное гемостатическое анти-

микробное на основе хитозана «Гемоспас Био» в форме гранул (ООО «МДК Медика», Россия).

Для каждого образца проводили не менее трёх параллельных экспериментов по каждому методу исследования. В качестве контроля использовали пробы, не содержащие хитозан.

В работе использовали следующие реактивы: ледяная уксусная кислота («Химмед», Россия), хлористоводородная кислота (х.ч.) («Реахим», Россия), дейтерированная вода (оксид дейтерия) 99.9 % (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США).

В работе были использованы следующие методы и оборудование:

одномерные протонные спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировали с помощью спектрометра Bruker Avance III HD 600 МГц, при 50 °С, используя растворы образцов в дейтерированной воде (D₂O) с добавлением 20 % раствора хлористоводородной кислоты. Обработку спектров выполняли в программе TopSpin 3.5p17. Расчеты степени деацетилирования (ДА) велись по формулам, приведенным в работе [9].

определение конформационного перехода макромолекул хитозана в зависимости от pH среды проводили с помощью УФ-спектрофотометра Agilent 8453 при 650 нм, с рабочей длиной кюветы 10 мм, по методике, представленной в работе [10]. Готовили водные растворы образцов концентрацией 0.3 мг/мл с добавлением 20 % раствора хлористоводородной кислоты до уровня pH 3.5–4.0. Для МГС «Образец №2» и «Гепоглос» дополнительно готовили растворы концентрацией 0.6 мг/мл. Величину pH измеряли с помощью pH-метра Fisher Scientific accumet excel XL60, светопропускание растворов регистрировали по мере добавления 2.5 % раствора натрия гидроксида.

Гемостатическую активность образцов в экспериментах *in vitro* изучали с использованием донорской крови с добавлением антикоагулянта натрия цитрата в соотношении 1:9:

для определения времени коагуляции (ВК) использовали методику Wu Sh. с соавт. [11].

динамику коагуляции определяли согласно методикам [2, 12]. Получали пленки исследуемых образцов на часовых стеклах. Далее на стекла с плёнками наносили по 0.2 мл крови и 0.025 мл 0.2М раствора кальция хлорида. Через 10 мин первое стекло погружали в стакан, содержащий 100 мл воды очищенной. Затем с интервалом в 5 мин в диапазоне 15–40 мин последовательно погружали в воду остальные стекла. Из полученных растворов отбирали аликвоту 15 мл, цен-

трифугировали 5 мин 3500 об/мин. С помощью УФ-спектрофотометра Agilent 8453 измеряли оптическую плотность супернатанта при 545 нм, строили графики зависимости средних значений оптической плотности исследуемых растворов от времени контакта крови с плёнками образцов МГС.

Оценку гемостатической активности образцов МГС проводили в экспериментах *in vivo* с соблюдением требований нормативных документов [13] на адаптированной модели повреждения бедренной артерии, описанной В. Kheirabadi и соавт. [14], в модификации Самохвалова И.М. и соавт. [1, 15, 16], на баранах романовской породы. Применение образцов МГС было выполнено после свободного артериального кровотечения продолжительностью 30 с. После применения МГС осуществляли ручную компрессию продолжительностью 3–5 мин, после чего выполняли тугую тампонаду раны. Эффективность МГС оценивали по показателям первичного гемостаза (через 5 мин после прекращения компрессии), вторичного гемостаза (через 120 мин после применения МГС) [17] и результатам «маршевой» пробы (пять интенсивных сгибательных и разгибательных движений поврежденной конечности). Результат пробы считали положительным при отсутствии возобновления кровотечения.

Результаты экспериментов обрабатывали методами математической статистики в соответствии с рекомендациями Государственной Фармакопеи РФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [18] с помощью программы «Microsoft Excel 2010». Рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение показателей в каждой исследуемой группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К числу показателей, с которыми наиболее часто связывают гемостатическую активность хитозана, относится молекулярная масса (ММ) и степень деацетилирования (ДА). Исследователи сходятся во мнении, что у образцов хитозана, обладающих гемостатической активностью, показате-

ль степени ДА составляет в среднем 75–95 %, в то время как показатель ММ изменяется в широком диапазоне 30–1000 кДа [2, 12, 19, 20]. В связи с этим связывать гемостатические свойства хитозана с показателем ММ не вполне корректно – низкая активность убедительно подтверждена только для низкомолекулярных образцов с ММ менее 10–20 кДа. При этом следует учитывать, что для сырья хитозана производители зачастую заменяют данный показатель значением вязкости. Точный расчет ММ при наличии показателя вязкости невозможен без знания всех условий, при которых он определялся [21], а большинство производителей и поставщиков хитозана не сообщают указанную информацию. Определение ММ хитозана в готовом изделии также зачастую не представляется возможным в связи с добавлением сшивающих агентов, антибактериальных средств, модификаторов.

Физико-химические свойства и гемостатическая активность образцов МГС *in vitro* представлены в таблице 1.

Время коагуляции крови под действием МГС определяли *in vitro* (рисунок 1)

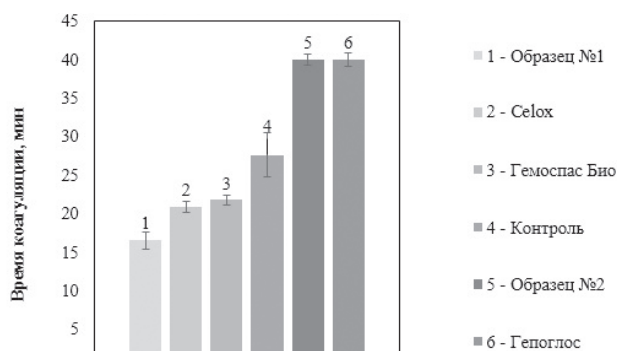


Рис. 1. Время коагуляции образцов крови в присутствии МГС

Гемостаз в контрольной группе наступил спустя 27.7 ± 2.8 мин. Наилучшие показатели отмечены для изделий «Образец №1» (16.6 ± 1.1 мин), «Celox» (20.9 ± 0.7 мин). Для МГС «Образец №2» и «Гепоглос» к моменту окончания эксперимента наступление гемостаза (образование сгустка) не зафиксировано.

Таблица 1.

Некоторые физико-химические свойства исследуемых образцов МГС и их гемостатическая активность *in vitro*

Образец	ДА, %	ВК, мин	Светопропускание растворов образцов при pH = 7.4, %	
			Концентрация 0.3 мг/мл	Концентрация 0.6 мг/мл
«Celox»	76.0	20.9 ± 0.7	66.1 ± 7.1	–
«Гепоглос»	96.0	нет гемостаза	95.0 ± 7.9	54.2 ± 6.8
«Образец №1»	86.2	16.6 ± 1.1	42.5 ± 8.2	–
«Образец № 2»	85.4	нет гемостаза	85.2 ± 8.4	78.0 ± 5.9
«Гемоспас Био»	77.6	21.8 ± 1.2	64.2 ± 7.7	–

Увеличение скорости формирования кровяного сгустка и агрегации форменных элементов крови связывают также с увеличением удельной поверхности и пористости частиц хитозана [22, 23]. В связи с этим было проведено исследование динамики коагуляции, которое иллюстрирует процесс взаимодействия крови с образцом на протяжении определенного временного интервала. Методом спектрофотометрии оценивается изменение количества абсорбированного гемоглобина в зависимости от длительности контакта крови с потенциальным гемостатическим агентом. Характер кривой и длительность образования сгустка определяют способность образца инициировать гемостаз. Результаты представлены на рисунке 2.

Установлено, что гемостатическая активность уменьшается в ряду: «Образец №1», «Гемоспас Био», «Селох», а наиболее низкие показатели выявлены у МГС «Гепоглос» и «Образец №2». При этом, наилучший результат зафиксирован для контрольной группы (без применения МГС), что полностью согласуется с результатами Ну Zh. с соавт. [2]. Можно предположить, что это объясняется условиями проведе-

ния эксперимента *in vitro* – отсутствием реального кровотока, препятствующего образованию сгустка.

Оценка эффективности образцов МГС *in vivo* проводилась на модели тяжелого ранения паха при иссечении стенки бедренной артерии. Полученные результаты представлены в таблице 2.

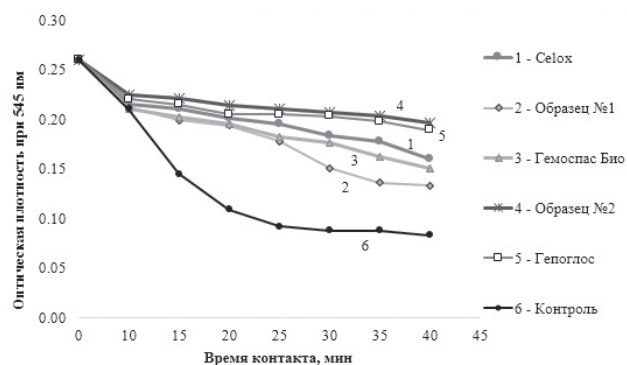


Рис. 2. Динамика коагуляции образцов крови в присутствии МГС

При применении МГС «Гепоглос» и «Образец №2» достичь гемостаза не удалось. Образцы «Селох», «Образец №1», «Гемоспас Био» обеспечили наступление вторичного гемостаза и положительную маршевую пробу в 100 % случаев, не-

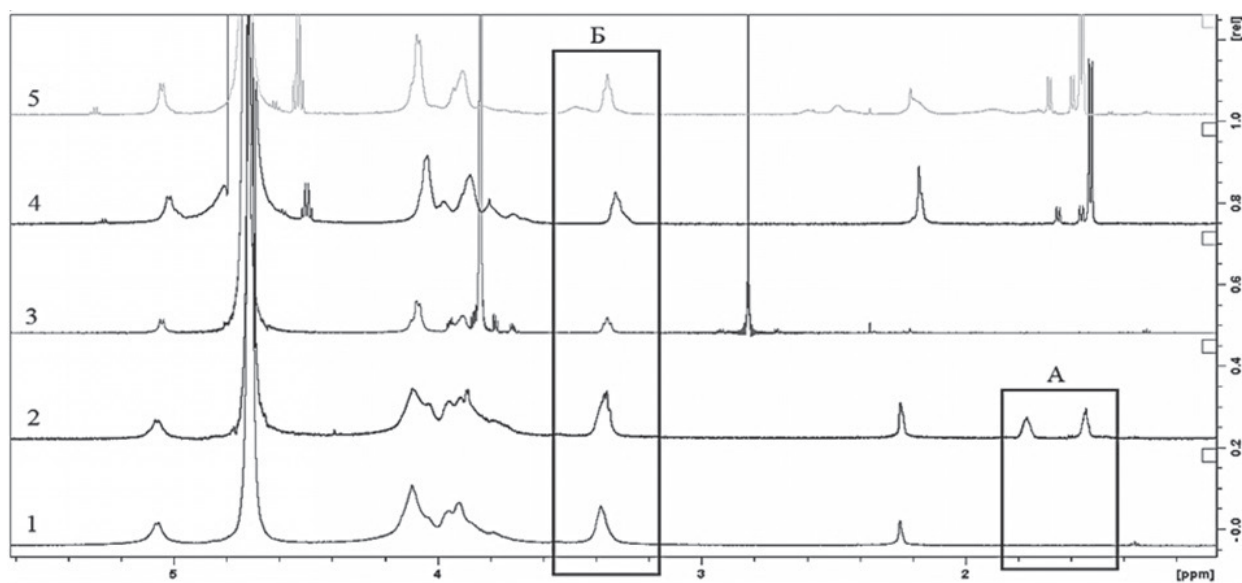


Рис. 3. Сравнение одномерных протонных ЯМР-спектров образцов МГС. Снизу вверх: 1 – «Образец №1», 2 – «Образец №2», 3 – «Гепоглос», 4 – «Селох», 5 – «Гемоспас Био». А и Б – области 1.5-1.8 ppm и 3.1-3.6 ppm, в которых проводилось сравнение сигналов образцов

Таблица 2.

Оценка гемостатической эффективности образцов МГС *in vivo*

Образец	Количество животных (n)	Первичный гемостаз (%)	Вторичный гемостаз (%)	Маршевая проба
«Селох»	3	67 %	100 %	+
«Гепоглос»	4	0 %	0 %	–
«Образец №1»	3	67 %	100 %	+
«Образец №2»	3	0 %	0 %	–
«Гемоспас Био»	4	100 %	100 %	+

смотря на то, что первичный гемостаз отмечался не у всех экспериментальных животных.

Для определения возможной причины низкой гемостатической активности МГС «Образец №2» и «Гепоглос» структуру образцов изучали методом спектроскопии ЯМР. Сравнение одномерных протонных спектров образцов представлено на рисунке 3.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что в результате экспериментального хранения «Образца №2» произошло изменение его структуры. В выделенной области А на рисунке 3 в спектре «Образца №2» наблюдаются дополнительные по сравнению со спектром «Образца №1» неидентифицированные сигналы. При сравнении спектра образца «Гепоглос» с другими образцами в области Б отмечается низкая интенсивность сигналов протонов, что может быть связано с меньшей концентрацией хитозана. Можно предположить, что с отмеченными особенностями МГС «Гепоглос» и «Образец 2» может быть связана их низкая гемостатическая активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, оценка протонного спектра ЯМР может применяться для оценки качества и прогнозирования активности гемостатических средств на основе хитозана. Недостатком метода является его высокая стоимость. Кроме того, анализ протонного спектра не позволяет судить о том, какая концентрация хитозана в МГС будет достаточной для инициирования гемостаза.

Биологическую активность соединений хитозана связывают с конформационным состоянием молекулы, и наиболее реакционноспособной считается спиральная конформация [25, 26]. Ранее было установлено [10], что конформация макромолекул хитозана в растворе зависит от рН среды. Путём измерения светопропускания растворов хитозана авторами были выявлены конформационные переходы в области значений рН 3.2–3.3 («клубок–спираль») и 4.8–6.0 («спираль–глобула»). В спиральной конформации наблюдается более интенсивное рассеяние света макромолекулами. При определенном значении рН раствора степень протонирования макромолекул достигает критического значения, и происходит переход из конформации «спираль» в конформацию «глобула». При этом у макромолекулы снижается растворимость, хитозан выпадает в осадок, раствор становится менее прозрачным, и его светопропускание снижается.

Мы предположили, что гемостатическая активность МГС будет зависеть от конформационного состояния макромолекул хитозана при

физиологических значениях рН: чем ближе рН конформационного перехода «спираль–глобула» к значению рН 7.35–7.45, тем выше кровоостанавливающие свойства образца. Для проверки указанного предположения проводили изучение изменения конформационного состояния макромолекул хитозана в составе МГС в эксперименте. За конформационный переход принимали скачкообразное снижение величины светопропускания раствора МГС не менее чем на 30 % от начального значения при изменении рН на 0.3–0.4 единицы в диапазоне рН 3.96–9.61, что свидетельствовало о переходе значительной части макромолекул в другое конформационное состояние.

При исследовании конформационных переходов МГС (рисунок 4) отмечено, что характер кривых не в полной мере аналогичен кривым образцов хитозана, полученных ранее другими группами авторов [10], что может быть связано с модификациями используемого при производстве МГС сырья (применение солей хитозана с различными заместителями, сшивающих агентов и др.) и вспомогательными веществами в составах коммерческих образцов гемостатиков (антибактериальные компоненты, консерванты и др.).

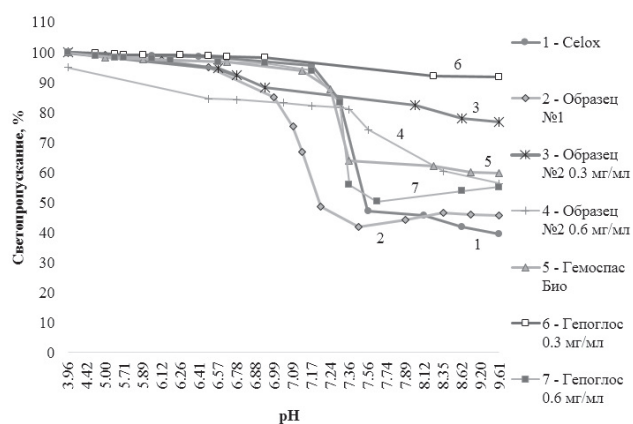


Рис. 4. Зависимость светопропускания растворов образцов МГС от рН среды раствора

Полученные данные свидетельствуют о том, что существует закономерность между конформационным состоянием макромолекулы хитозана и его гемостатической активностью. Низкая способность инициировать гемостаз наблюдалась у тех образцов МГС («Образец №2» и «Гепоглос» в концентрации 0.3 мг/мл), для которых в физиологическом диапазоне рН не наблюдалось скачкообразного изменения светопропускания раствора, что может свидетельствовать об отсутствии перехода значительной части макромолекул из состояния «спираль» в состояние «глобула».

Результаты изучения кривой светопропускания, которая свидетельствует об отсутствии перехода большей части молекул образца «Гепоглос» 0.3 мг/мл из состояния «спираль» в состояния «глобула» в изученном диапазоне рН, позволили подтвердить предположение о низком содержании хитозана в МГС «Гепоглос», которое, по-видимому, и определило его низкую гемостатическую активность. Увеличение концентрации с 0.3 мг/мл до 0.6 мг/мл приводит к увеличению концентрации молекул хитозана, перешедших в состояние «глобула», что сопровождается скачкообразным снижением светопропускания.

При увеличении концентрации «Образца №2» скачкообразного изменения светопропускания не произошло, что согласуется с данными ЯМР спектроскопии и позволяет сделать вывод, что низкая гемостатическая активность в данном случае, вероятно, связана со структурными изменениями хитозана.

Таким образом, вопреки нашему исходному предположению, гемостатическая активность МГС на основе хитозана более активно проявляется в конформации «глобула». Полученные данные полностью согласуются с результатами экспериментов *in vivo* и *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов было установлено следующее:

- 1) Метод спектроскопии ЯМР может применяться для контроля качества сырья хитозана;
- 2) Выявлена связь гемостатической активности образцов МГС на основе хитозана с конформационным состоянием при значениях рН, близких к физиологическим. Гемостатическая активность была выявлена у тех образцов МГС, у которых при значениях рН раствора, близких к физиологическим, отмечался переход значительной части молекул из состояния «спираль» в состояние «глобула», что сопровождалось скачкообразным изменением светопропускания раствора;
- 3) Определение конформационного состояния МГС на основе хитозана методом спектрофотометрии может рассматриваться как метод, позволяющий выявить образцы МГС, не обладающие гемостатической активностью, однако для окончательного подтверждения данного утверждения требуется проведение дополнительных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Самохвалов И.М., Рева В.А., Пронченко А.А., Юдин А.Б., Денисов А.В. // Политравма. Реабилитация. 2013. № 1. С. 67–86.

2 Hu Zh., Lu S., Cheng Y., Kong S., Li S., Li Ch., Yang L. // *Molecules*. 2018. Vol. 23, P. 3147.

3 Singh M.K., Prajapati S.K., Mahor A., Rajput N., Singh R. // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2011. Vol. 2, No. 9, pp. 2266–2277.

4 Yadu N.VK., Raghvendra Kumar M., Aswathy V., Parvathy P., Sunija S., Neelakandan MS., Nitheesha Sh., Vishnu KA // *Res. Dev. Material Sci.* 2017. Vol. 2, No. 4, pp. 1–16.

5 Pogorielov M.V. // *European Journal of Medicine. Series B 2.* 2015. pp. 24–33.

6 Мукатова М.Д., Киричко Н.А., Романенкова Е.Н. // *Вестник МГТУ*. 2015. Т. 18. № 4. С. 641–646.

7 Шафалинов В.А., Бояринцев В.В., Фрончек Э.В., Трофименко А.В., Иващенко А.А. Патент РФ, № RU 2519220 C1, 2014.

8 ОФС 1.1.0009.15 Сроки годности лекарственных средств. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т 1. М.: 2016.

9 Хоменко А.Ю. Дисс. канд. физ.-мат. наук. Москва, 2016, 168 с.

10 Apryatina K.V., Tkachuk E.K., Smirnova L.A. // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 235, P. 115954.

11 Wu Sh., Huang Zh., Yue J., Yue J., Liu Di, Wang T., Ezanno P., Ruan Ch., Zhao X., Lu W.W., Pan H. // *Carbohydrate Polymers*. 2015. Vol. 132, pp. 295–303.

12 Yang J., Tian F., Wang Zh., Wang Q., Zeng Y.-J., Chen Sh.-Q. // *Journal of Biomedical Research Part B: Applied Biomaterials*. 2008. Vol. 84, pp. 131–137.

13 National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th Edition. Washington, DC: National Academy Press; 2011, p. 246.

14 Kheirabadi B.S., Scherer M.R., Estep J.S., Dubick M.A., Holcomb J.B. // *J. trauma injury, infection and critical care*. 2009. Vol. 67, No. 3, pp. 450–459.

15 Самохвалов И.М., Головкин К.П., Рева В.А., Денисов А.В., Сохранов М.В., Зхабин А.В., Казначеев М.В. // *Вестник Российской Военно-Медицинской Академии*. 2013. №4 (44). С. 187–191.

16 Денисов А.В., Носов А.М., Телицкий С.Ю., Демченко К.Н. // *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. 2018. № 3. С. 65–72.

17 Gale A.J. // *Toxicol Pathol*. 2011. Vol. 39, No. 1, pp. 273–280.

18 ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Госу-

государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т 1. М.: 2018.

19 Hattori H., Ishihara M. // *Biomed. Mater.* 2015. I. 10, P. 015014.

20 Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A. // *Curr. Chem. Biol.* 2009. Vol. 3, No. 2, pp. 203–230.

21 Lyalina T., Zubareva A., Lopatin S., Zubov V., Sizova S., Svirshchevskaya E. // *Organic and Medicinal Chemistry II.* 2017. Vol. 1, I. 3, P. 555562.

22 Pan M., Tang Z., Tu J., Wang Zh., Chen Q., Xiao R., Liu H. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2018. No. 85, pp. 27–36.

23 Li J., Wu X., Wu Y., Tang Z., Sun X., Pan M., Chen Y., Li J., Xiao R., Wang Zh., Liu H. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. No. 77, pp. 411–419.

24 Hsu Sh.-Ch., Hsu Sh.-h., Chang Sh.-W. // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. Vol. 6, No. 1, pp. 298–307.

25 Al-Zebary N., Best S.M., Cameron R.E. // *J. Phys.: Materials.* 2019. Vol. 2, P. 015003.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический Университет»

*Кадысева О. В., научный сотрудник

E-mail: oksana.kadyseva@mail.ru

Стрелова О. Ю., кандидат химических наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтической химии

E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

Гребенюк А. Н., доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической химии

E-mail: grebenyuk_an@mail.ru

ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Быков В. Н., доктор медицинских наук, профессор

E-mail: bykov_imm@mail.ru

ООО «Специальная и Медицинская Техника»
Таранченко В. Ф., доктор химических наук, доцент

E-mail: victaran@rambler.ru

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

*Kadyseva O. V., Researcher

E-mail: oksana.kadyseva@mail.ru

Strelova O. Y., PhD., Associate Professor, Head of pharmaceutical chemistry dept.

E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

Grebenyuk A. N., M.D., Full Professor, dept. of pharmaceutical chemistry

e-mail: grebenyuk_an@mail.ru

Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

Bykov V. N., M.D., Full Professor

E-mail: bykov_imm@mail.ru

«Special & Medical Equipment» LLC
Taranchenko V. F., PhD., DSci., Associate Professor

E-mail: victaran@rambler.ru

INFLUENCE OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF CHITOSAN-BASED HEMOSTATIC PRODUCTS ON THEIR HEMOSTATIC EFFICIENCY *IN VITRO* AND *IN VIVO*

O. V. Kadyseva^{1,3}, V. N. Bykov², O. Y. Strelova¹, V. F. Taranchenko³, A. N. Grebenyuk^{1,3}

¹St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

²The Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

³«Special & Medical Equipment» LLC

Abstract. Chitosan-based Local Hemostatic Agents (LHA) are widely used as agents for stopping massive arterial and venous bleeding during armed conflicts and in disaster medicine, and are also increasingly used in healthcare. However, there is no consensus on the physicochemical parameters that determine the hemostatic properties of chitosan. Still the most reliable methods for conforming the hemostatic activity

of LHA remain *in vitro* and *in vivo* experiments with modeling in large animals. In addition, there are no standard approaches to quality control of chitosan raw materials and medical products based on it. The target of the study was to determine additional physicochemical characteristics that would make it possible to predict the hemostatic activity of LHA based on chitosan without the use of a biological experiment.

In the course of the studies, the influence of physicochemical properties on the effectiveness of LHA was considered by *in vitro* and *in vivo* methods. By NMR method it was found that a decrease of the hemostatic activity of LHA may be accompanied by a change in the chemical structure during prolonged storage or by the influence of chitosan concentration. By spectrophotometry revealed a consistent pattern between the hemostatic activity and the conformational state of chitosan macromolecules. It has been shown that as an additional parameter testifying to the ability of chitosan to initiate hemostasis, the pH of the «rigid rod-globule» conformational transition can be considered. Hemostatic activity of LHA based on chitosan is more active in the conformation «globule». The greatest efficiency in the experiment was revealed for samples in which, at a solution pH close to physiological value, a significant part of the molecules transitioned from the «rigid rod» state to the «globule» state, which was accompanied by a jump-like change in the light transmission of the solution. The obtained data are completely consistent with the results of *in vitro* and *in vivo* experiments.

Keywords: chitosan, bleeding, hemostasis, degree of deacetylation, conformation, NMR, spectrophotometry.

REFERENCES

- 1 Samohvalov I.M., Reva V.A., Pronchenko A.A., Yudin A.B., Denisov A.V. Politravma. Reabilitatsiya, 2013, No. 1, pp. 67–86.
- 2 Hu Zh., Lu S., Cheng Y., Kong S., Li S., Li Ch., Yang L. *Molecules*, 2018, Vol. 23, P. 3147.
- 3 Singh M.K., Prajapati S.K., Mahor A., Rajput N., Singh R. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2011, Vol. 2, No. 9, pp. 2266–2277.
- 4 Yadu N.VK., Raghvendrakumar M., Aswathy V., Parvathy P., Sunija S., Neelakandan MS., Nitheesha Sh., Vishnu KA *Res. Dev. Material Sci.*, 2017, Vol. 2, No. 4, pp. 1–16. DOI: 10.31031/RDMS.2017.02.000543.
- 5 Pogorielov M.V. *European Journal of Medicine, Series B* 2, 2015, pp. 24–33. DOI: 10.13187/ejm.s.b.2015.2.24.
- 6 Mukatova M.D., Kirichko N.A., Romanenkova E.N. *Vestnik MSTU*, 2015, Vol. 18, No. 4, pp. 641–646.
- 7 Shafalinov V.A., Boyarintsev V.V., Fronchek E.V., Trofimenko A.V., Ivashchenko A.A. Patent RF, no. RU 2519220 C1, 2014.
- 8 Gosudarstvennaya farmakopeya XIII izd., Vol. 1, Moscow, 2016.
- 9 Khomenko A.J. Diss. cand. phys.-math. nauk. Moscow, 2016, 168 p.
- 10 Apryatina K.V., Tkachuk E.K., Smirnova L.A. *Carbohydrate Polymers*, 2020, Vol. 235, P. 115954. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115954.
- 11 Wu Sh., Huang Zh., Yue J., Liu Di, Wang T., Ezanno P., Ruan Ch., Zhao X., Lu W.W., Pan H. *Carbohydrate Polymers*, 2015, Vol. 132, pp. 295–303. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.06.030.
- 12 Yang J., Tian F., Wang Zh., Wang Q., Zeng Y.-J., Chen Sh.-Q. *Journal of Biomedical Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008, Vol. 84, pp. 131–137. DOI: 10.1002/jbm.b.30853.
- 13 National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th Edition. Washington, DC: National Academy Press; 2011, p. 246.
- 14 Kheirabadi B.S., Scherer M.R., Estep J.S., Dubick M.A., Holcomb J.B. *J. trauma injury, infection and critical care*, 2009, Vol. 67, No. 3, pp. 450–459.
- 15 Samohvalov I.M., Golovko K.P., Reva V.A., Denisov A.V., Sohranov M.V., Zhabin A.V., Kaznacheev M.V. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2013, No. 4(44), pp. 187–191.
- 16 Denisov A.V., Nosov A.M., Telitskii S.J., Demchenko K.N. *Medical-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*, 2018, No. 3, C. 65–72.
- 17 Gale A.J. *Toxicol Pathol.*, 2011, Vol. 39, No. 1, pp. 273–280. DOI: 10.1177/0192623310389474.
- 18 Gosudarstvennaya farmakopeya XIV izd., Vol. 1, Moscow, 2018.
- 19 Hattori H., Ishihara M. *Biomed. Mater.*, 2015, I. 10, P. 015014. DOI: 10.1088/1748-6041/10/1/015014.
- 20 Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A. *Curr. Chem. Biol.*, 2009, Vol. 3, No. 2, pp. 203–230.
- 21 Lyalina T., Zubareva A., Lopatin S., Zubov V., Sizova S., Svirshchevskaya E. *Organic and Medicinal Chemistry IJ.*, 2017, Vol. 1, I. 3, P. 555562. DOI: 10.19080/OMCIJ.2017.01.555562.

22 Pan M., Tang Z., Tu J., Wang Zh., Chen Q., Xiao R., Liu H. *Mater. Sci. Eng. C*. 2018, No. 85, pp. 27–36. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.015.

23 Li J., Wu X., Wu Y., Tang Z., Sun X., Pan M., Chen Y., Li J., Xiao R., Wang Zh., Liu H. *Mater. Sci. Eng. C*. 2017, No. 77, pp. 411–419. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.276.

24 Hsu Sh.-Ch., Hsu Sh.-h., Chang Sh.-W. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2020, Vol. 6, No. 1, pp. 298–307. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b01101.

25 Al-Zebary N., Best S.M., Cameron R.E. *J. Phys.: Materials*, 2019, Vol. 2, P. 015003. DOI: 10.1088/2515-7639/aae9ab.