

ХИМИЯ

УДК 547.458.1:615.273.52

НОВЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИЦИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

© 2014 г. **К.В. Апрятина, Л.А. Смирнова, А.Е. Мочалова, А.С. Корягин**

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kristinka200716@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2013

Разработана стратегия получения новой кровоостанавливающей полимерной композиции на основе хитозана и солей кальция. Дано обоснование выбора состава композиции. Кровоостанавливающие свойства образцов исследованы *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных животных. Выбрано оптимальное соотношение компонентов композиции, обеспечивающее свертывание крови за время, не превышающее 40 с.

Ключевые слова: хитозан, ионы кальция, свертываемость крови, ранозаживление.

Введение

Травмы, ожоги, ранения, хирургические вмешательства чаще всего сопровождаются кровотечениями, в ряде случаев обильными, которые сложно купировать. Существующие гемостатические [1] и противоожоговые [2] средства не полностью удовлетворяют предъявляемым к ним требованиям, таким как остановка истечения крови за минимальный срок, предотвращение раздражения, высокая конгруэнтность раневой и ожоговой поверхности, биосовместимость и быстрая регенерация поврежденных тканей. Поэтому актуальным является создание материалов, обладающих этими свойствами.

В качестве исходного сырья для создания таких материалов перспективно использование деацетилированного производного природного полисахарида хитина – хитозана (аминополисахарида 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкана), благодаря его уникальным свойствам. Известно, что хитозан обладает антимикробной активностью, гипоаллергенностью, способствует регенерации тканей, активизирует заживление ожоговой и раневой поверхностей без образования рубцов [3]. Кроме того, макромолекулы хитозана характеризуются высокой адсорбционной способностью и биологической совместимостью и могут быть с успехом использованы в качестве матриц-носителей питательных веществ, лекарственных средств, металлов в ионной форме и их наночастиц.

Цель данной работы – получение кровоостанавливающих средств на основе хитозана, комплексно связанного с ионами кальция, и проверка их эффективности *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных животных.

Экспериментальная часть

В работе был использован хитозан с молекулярной массой 1.05×10^5 и степенью деацетилирования 0.80, хлорид кальция «х. ч.» (ОАО «Мосхимфармпрепараты»). Растворители – водные растворы органических кислот.

Для исследования общего времени свертывания крови проводили лабораторные испытания *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных животных. В качестве экспериментальных животных брали беспородных самок крыс. Готовили растворы хитозана (3 масс.%) в водных растворах органических кислот (1.5–3 масс.%). Содержание хлорида кальция варьировали от 0.2 до 100 ммоль/л. Испытания *in vitro* проводили на гемокоагулографе N-331. Для этого у экспериментальных животных из подъязычной вены отбирали кровь и сразу же помещали ее в кювету, приливали 100 мкл исследуемого раствора и снимали показания прибора. Для испытаний *in vivo* всем животным предварительно вводили наркоз, затем препарировали кожный лоскут с левого бедра размером примерно 2×2 см, оголив бедренную вену, делали ее надрез, на раны наносили

исследуемые растворы и засекали время свертывания крови.

Дополнительно исследовали регенерацию поврежденных участков после обработки раствором. В течение двух недель раз в три дня раны экспериментальных животных обрабатывали исследуемым раствором. Результат сравнивали с состоянием контрольной группы животных, раны которых раствором не обрабатывали.

Результаты и их обсуждение

При разработке кровоостанавливающей полимерной композиции был проведен анализ научной литературы по механизму свертывания крови [4]. Процесс свертывания крови представляет собой каскад ферментативных реакций, в котором проферменты (предшественники), переходя в активное состояние, способны активировать другие факторы свертывания крови (рис. 1).

В основе процесса свертывания крови лежит превращение растворимого белка плазмы фибриногена в нерастворимый белок – фибрин. К числу факторов свертывания крови относятся ионы кальция и протромбин. Последний вырабатывается в печени, причем для его образования необходим витамин К. Процесс не может начаться без еще одного компонента – тромбопластина – белково-фосфолипидного фрагмента мембран тромбоцитов, клеток сосудистой стенки, разрушающихся при кровотечении. В при-

сутствии ионов кальция, тромбопластина и протромбина протромбин преобразуется в тромбин, который превращает растворимый белок фибриноген в нерастворимый фибрин. Важную роль в механизме прекращения кровотечений играют тромбоциты. До тех пор, пока сосуды не повреждены, тромбоциты не прилипают к стенкам сосудов, но при нарушении их целостности или появлении патологической шероховатости они оседают на поврежденной поверхности, соединяются друг с другом и высвобождают вещества, стимулирующие свертывание крови. Так образуется сгусток крови, который при разрастании превращается в тромб. Таким образом, одним из важнейших агентов механизма тромбообразования являются ионы кальция, выполняющие две функции:

1. Ионы кальция необходимы для придания нативной конформации факторам свертывания, после чего последние способны принимать участие в ферментативных реакциях гемостаза.

2. Ионы кальция являются связующими мостиками между белковыми компонентами и клеточными мембранами. За счет таких кальциевых мостиков происходит первоначальное ориентирование факторов свертывания крови на фосфолипидной матрице, и в результате чего на белковых молекулах открываются активные центры, на которых проходят ферментативные реакции гемостаза.

Исходя из изложенного, разработана композиция на основе растворов хитозана, комплексно связанного с ионами кальция.

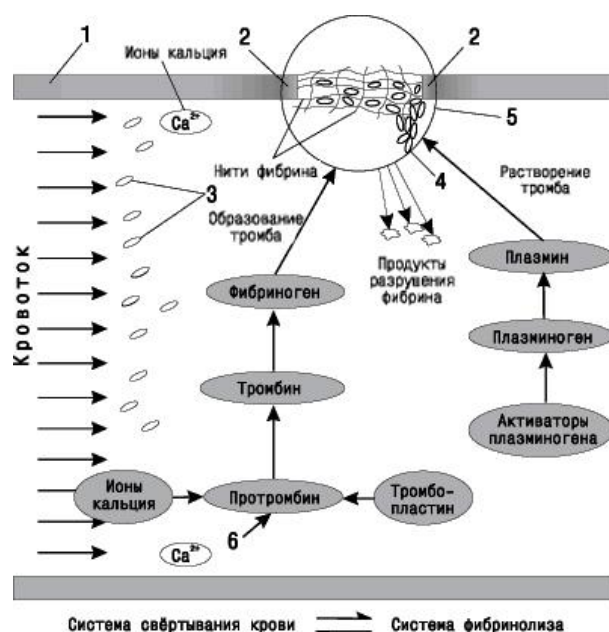


Рис. 1. Динамическое равновесие систем свертывания крови и фибринолиза: 1 – стенка кровеносного сосуда; 2 – повреждение стенки сосуда; 3 – тромбоциты; 4 – адгезия и агрегация тромбоцитов; 5 – тромб; 6 – факторы свертывания [4]

Таблица

Время свертывания крови при различных концентрациях ионов кальция

Концентрация ионов кальция в композиции, ммоль/л	0.5	2	5	10	20
Время свертывания крови, с	137	100	60	40	45

В результате лабораторных испытаний *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных животных изучены кровоостанавливающие свойства растворов хитозана, комплексно связанного с ионами кальция. Провели 2 серии опытов *in vitro* – с цельной и цитратной кровью. В первой серии опытов исследовали влияние концентрации ионов кальция в композиции на время свертывания цельной крови (таблица).

Из данных таблицы видно, что максимальный эффект свертывания крови достигается при использовании растворов с концентрацией ионов кальция 10 ммоль/л. «Глухой» опыт с водными растворами кальция при тех же концентрациях без хитозана показал время свертывания крови, варьирующееся от 163 до 240 с.

Во второй серии опытов исследовали время свертывания крови при добавлении в нее антикоагулянта – цитрата натрия (цитратная кровь), который повсеместно используют в экспериментальной биологии и медицине при консервации крови. Данные о времени свертывания крови при добавлении в нее исходной композиции – раствора хитозана, комплексно связанного с ионами кальция, представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что увеличение содержания ионов кальция в комплексе с хитозаном приводит к существенному снижению времени свертывания даже цитратной крови, достигая 20 с при концентрации 100 ммоль/л. При дальнейшем повышении содержания ионов время свертывания цитратной крови остается на уровне 20–30 с. В то же время в «глухом» опыте в цитратную кровь добавляли водный раствор соли кальция без хитозана с концентрацией ионов

кальция 90 ммоль/л, и время свертывания крови составило 180 с.

Для проведения исследований *in vivo* на экспериментальных животных использовали концентрацию ионов кальция 10 ммоль/л. По результатам серии опытов ($n = 10$) среднее время остановки кровотечения составило 35–40 с. На основании полученных результатов было выбрано оптимальное соотношение компонентов, благодаря которому композиция обеспечивает гемостаз за время, не превышающее 40 с.

Полагаем, что хитозан при гемостазе выполняет функцию матрицы – своеобразного аналога бислоя мембраны клеток крови и их фрагмента – тромбопластина, тем самым позволяя добиться существенного увеличения скорости тромбообразования.

Были проведены исследования ранозаживляющих и противовоспалительных свойств полученной композиции. Наблюдение за экспериментальными животными показало, что на ранах, обработанных данной композицией, эпителий формировался в течение недели и без инфицирования, в то время как у контрольных животных ранозаживление происходило в два раза медленнее. Следует отметить, что у интактных животных наблюдалось воспаление и нагноение поврежденных участков кожи. Таким образом, хитозан способствует эпителизации раны, выступая в качестве энергетического и пластического материала.

Заключение

Разработанная нами композиция на основе хитозана, комплексно связанного с ионами кальция, оказывает многофункциональное действие на поврежденные участки кожи. При нанесении композиции в виде раствора (геля) достигаются высокая конгруэнтность препарата с раневой поверхностью и ускоренное кровоостанавливающее действие. Композиция способствует быстрой эпителизации раны без инфицирования, а пленка, образующаяся на поврежденном участке, не вызывает раздражения и болезненных ощущений. Возможно модифицирование композиции путем введения лекарственных препаратов.

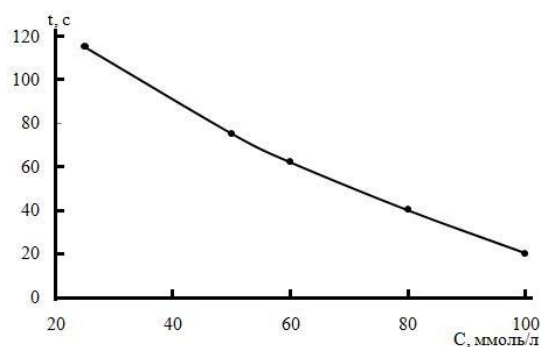


Рис. 2. Зависимость времени свертывания цитратной крови от концентрации ионов кальция

Список литературы

1. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. 3-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 944 с.
2. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги. Руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2000. 488 с.
3. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. 368 с.
4. Физиология человека / Под ред. В.М. Покровского, Г.Ф. Коротько. М.: Медицина, 1997. Т. 1. 448 с.

NOVEL CHITOSAN-BASED POLYMER COMPOSITES FOR MEDICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS

K.V. Apyratina, L.A. Smirnova, A.E. Mochalova, A.S. Koryagin

A strategy to obtain a new hemostatic chitosan- and calcium salt-based composite has been developed. The justification of the choice for the chemical composition of the composite is presented. Hemostatic properties of samples have been studied *in vitro* and *in vivo* on experimental animals. An optimal ratio of the composition components has been obtained to provide the blood clotting not exceeding 40 s.

Keywords: chitosan, calcium ions, blood clotting, wound healing.

References

1. Kukes V.G. Klinicheskaja farmakologija. 3-e izd. M.: GJeOTAR-Media, 2006. 944 s.
2. Paramonov B.A., Porembskij Ja.O., Jablonskij V.G. Ozhogi. Rukovodstvo dlja vrachej. SPb.: SpecLit, 2000. 488 s.
3. Hitin i hitozan: poluchenie, svojstva i primenenie / Pod red. K.G. Skrjabina, G.A. Vihorevoj, V.P. Varlamova. M.: Nauka, 2002. 368 s.
4. Fiziologija cheloveka / Pod red. V.M. Pokrovskogo, G.F. Korot'ko. M.: Medicina, 1997. T. 1. 448 s.