

Майстренко Дмитрий Николаевич,

доктор медицинских наук, директор
ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8174-7461>

Евтушенко Владимир Иванович,

доктор биологических наук, руководитель
лаборатории генной инженерии,
ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1577-4178>

Георгобиани Виктория Владимировна,

научный сотрудник лаборатории генной инженерии,
ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-6098-4737>

Николаев Дмитрий Николаевич,

кандидат медицинских наук, врач сердечно-сосудистый хирург,
ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0501-7007>

Попова Алена Александровна, научный сотрудник,

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8077-9832>

НОВОЕ МЕСТНОЕ ГЕМОСТАТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО: СТРУКТУРА И СВОЙСТВА

Аннотация: Получено эффективное местное гемостатическое средство на основе модифицированной пленки хитозана с повышенной адгезией к влажной раневой поверхности, не требующее дополнительных материалов для его фиксации.

Поликомпозитная пленка, полученная методом высушивания, является биodeградируемой, обладает хорошими гемостатическими свойствами, сильной адгезией к раневой поверхности, эластичностью и прозрачностью. Данное медицинское изделие является универсальным и подходит как для наружных ранений, так и для интраоперационного применения при работе с паренхиматозными органами и сосудами.

Ключевые слова: хитозан, таннин, аргинин, гемостаз, адгезия.

Введение

На сегодняшний день остается актуальной проблема создания нового местного гемостатического средства, которое бы отвечало следующим требованиям: высокая адгезия к влажным кровотокающим поверхностям тканей, простота использования, биосовместимость, отсутствие токсичности, а также атравматичность при удалении после использования.



На современном этапе развития медицинская промышленность предлагает множество вариантов местных гемостатических средств и остается крайне важным достижение следующих целей:

- 1) Высокая адгезия к влажным, деформирующимся поверхностям ран
- 2) Устойчивость к размыванию при контакте с раной, что предопределяет сохранение средства в нужной локализации и препятствует возобновлению кровотечения.
- 3) Эластические свойства, что обеспечит предотвращение выдавливания местного гемостатического средства из раны, сохраняя его эффективность.
- 4) Возможность обеспечить стягивание краев раны, уменьшая ее зияние и площадь кровоточащей поверхности.
- 5) Отсутствие токсичности локального гемостатического средства.

Одним из перспективных направлений в создании нового местного гемостатического средства является химическая модификация хитозана. Местные гемостатические средства на основе хитозана представлены большим количеством медицинских изделий, которые рекомендованы главным образом для оказания первой медицинской помощи при ранениях. Практически все коммерчески доступные местные кровоостанавливающие средства на основе хитозана относятся к изделиям первого (порошки) и второго (повязки и губки, импрегнированные гемостатиком) поколения, которые требуют наружной фиксации и последующего удаления из раны [1].

Несмотря хорошие гемостатические свойства и эффективность всех этих препаратов к их общим недостаткам относятся: низкая адгезивность, что заключается в необходимости дополнительной фиксации препарата к ране, а также то, что действующее вещество, содержащее хитозан или его соли, при контакте с жидкостями организма теряет механическую прочность и постепенно размокает. Кроме того, все перечисленные аналоги рекомендованы, как правило, к использованию только при наружных ранениях. Данные особенности диктуют необходимость дальнейших исследований, направленных на химическую модификацию хитозана при создании местных гемостатических средств.

Хитозан – это природный полисахарид, выделяемый из панцирей ракообразных; положительный заряд $-NH_3$ группы хитозана электростатически взаимодействует с анионами на поверхности эритроцитов, что приводит к интенсивной агрегации эритроцитов вокруг ранения с образованием тромбов, которые быстро останавливают кровотечение. Хитозан способствует активации тромбоцитов и усилению их адгезии. Кроме того, *in vivo* хитозан приводит к контактной активации факторов свертывания крови, укрепляя сгусток. Он биологически инертен и способен к биодеградации. Лизоцим является основным ферментом, ответственным за деградацию хитозана *in vivo* путем гидролиза ацетилированных остатков. Лизоцим содержится в том числе в крови [2]. Конечными продуктами деградации являются растворимые олигосахариды хитозана небольшой длины. Хитозан оказывает стимулирующее действие на макрофаги, а также является хемоаттрактантом для нейтрофилов, что способствует ускорению биодеградации хитозана. Хитозан обладает также неспецифической антимикробной активностью и способствует заживлению ран [3.4]. Все эти свойства делают хитозан одним из самых востребованных веществ для создания местных гемостатических средств и тканевых биоадгезивов.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: хитозан пищевой кислоторастворимый, 150-900 кДа (ООО Биопрогресс), кислота уксусная ХЧ ледяная (ООО Вектон), глицерин ЧДА (ООО Вектон), таннин гидролизуемый (Русхим-магазин), L-аргинин (НПП «ПанЭко»), поли L-аргинин гидрохлорид 15-70 кДа (Sigma-Aldrich), протамина сульфат спермы лосося (Grade X, Sigma-Aldrich).



Местное гемостатическое средство изготавливается в виде двуслойной пластины, состоящей из наружного несущего слоя и внутреннего адгезивного слоя.

Сначала формируют несущий слой, для этого на ровную поверхность заливают необходимый объем (в зависимости от требуемого размера формируемого слоя) водного раствора, содержащего 2 масс.% ацетата хитозана и 1 масс.% глицерина. Высушивают в течение 48 часов при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Затем формируют внутренний адгезивный слой, для чего на высушенную несущую подложку заливается водный раствор содержащий 2 масс.% высокомолекулярного хитозана, 1 масс.% уксусной кислоты, 1 масс.% таннина, 1 масс.% аргинина или 1 масс.% полиаргинина или 1 масс.% протамина сульфата. Второй, адгезивный слой также высушивается при комнатной температуре на ровной поверхности в течение 48 часов. После высыхания пленка готова к использованию.

Аппликация изделия на кровоточащую поверхность паренхиматозного органа, сосуда или наружного ранения производится стороной, содержащей хитозан, аргинин и таннин. Далее осуществляется плотное прижатие пленки к раневой поверхности в течение 1 минуты. После чего пленка остается на поверхности повреждения на необходимый срок.

Результаты.

1. Исследование адгезивных свойств.

Для количественной оценки силы адгезии разработанного нами гемостатического средства в виде поликомпонентной пластины было произведено измерение прочности на разрыв в сравнении со следующими местными гемостатическими средствами, производимыми в настоящее время медицинской промышленностью:

1. Гемостатическое средство «ГЕМОХИТ» (Патент RU2681184C1), при изготовлении которого используется поперечно сшитый эпоксидной смолой хитозан. Средство имеет форму губки;

2. «HEMCON GUARDACARE PRO» (Патент US9205170B2) покрытия для ран, содержащие хитозан;

3. «TACHOSIL» (Патент US9517287B2), который представляет собой коллагеновую губку, покрытую фибриногеном и тромбином, выделенными из крови человека.

Описание опыта:

Нами было проведено несколько предварительных тестов сравнения адгезивных свойств при помощи измерения прочности на разрыв с контактной поверхностью электронных весов. Для оценки предела прочности на растяжение разработанной композиции в сравнении с известными местными гемостатическими средствами использовались портативные весы, закрепленные на исследовательском столе. К платформе электронных лабораторных весов крепилась гладкая стеклянная пластина (10x10 см). Далее из предметного стекла вырезался квадрат площадью 6,55см², в центре которого закреплялась скоба для подъемного устройства. Перед испытанием прилегающие поверхности тщательно очищались и обезжиривались 96% этанолом. На рабочую сторону стеклянного квадрата по центру наносилось 0,1 г исследуемого местного гемостатического средства, увлажненного 1 мл деионизированной воды. Стекла сближали между собой с усилием. После тарирования весов стеклянные пластины отрывали друг от друга с силой, перпендикулярной плоскости, до момента разрушения связей, который оценивался по обнулению показаний весов на видеозаписи. Во время приложения усилия весы считали в обратном направлении вплоть до разрыва.

Расчёт прочности на разрыв рассчитывалась из максимально достигнутого усилия растяжения F_m и площади поперечного сечения образца в начале испытания на растяжение: прочность при растяжении $R_m = \text{максимальное усилие растяжения } F_m / \text{площадь поперечного сечения } S_0$. Прочность при растяжении указывается в МПа (мегапаскалях). Визуально исследование выглядело как представлено на рисунке.



Таблица 1.

Результаты сравнения адгезивных свойств местных гемостатических средств

Наименование медицинского изделия	Новое местное гемостатическое средство	ГЕМОХИТ	HEMCON GUARDACARE PRO	TACHOSIL
Прочность на разрыв, МПа	1,2	0,5	0,6	0,4



Рисунок 1. Модель лабораторного эксперимента для исследования адгезивных свойств местных гемостатических средств

Результаты сравнительного эксперимента показали, что разработанное на основе композитной пластины хитозана гемостатическое средство, обладает усиленными адгезивными свойствами в сравнении с известными аналогами.

2. Исследование адгезивных и гемостатических свойств гемостатической пленки на животных моделях

Экспериментальное исследование разработанного нами гемостатического средства проводили на свиньях породы русская белая, самцах, вес свиней 80-100 кг. Количество крупных биологических моделей – 2. Исследования проведены после одобрения комитета по этике ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России.

Оценка интенсивности кровотечения сразу после нанесения ранения с последующей визуальной оценкой интенсивности кровотечения по шкале VIBe SCALE.

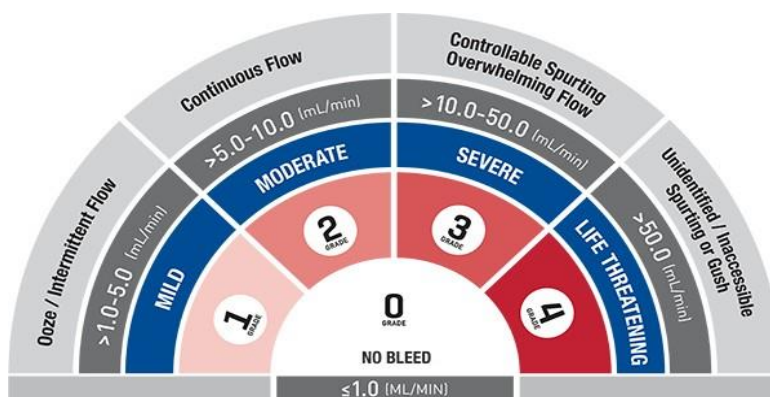


Рисунок 2. Шкала оценки интенсивности кровотечения VIBe SCALE



Ход эксперимента №1:

В условиях операционной, под эндотрахеальным наркозом, выполнена срединная лапаротомия. Правая доля печени выведена в рану на салфетках. Скальпелем иссечен участок правой доли размерами 2x2x0.5см. Дефект осушен салфеткой. Накрыт опытным образцом пленки, диаметром 5см, прижат салфеткой. Экспозиция 20 секунд. Через 20 секунд отмечено плотное прилегание к ткани печени с хорошей адгезией по всей поверхности. Кровотечения не наблюдается. Наблюдение в течение 3 минут 30 секунд для контроля гемостаза. На четвертой минуте адгезия к ткани по-прежнему хорошая. Печень накрыта влажной салфеткой. Переход к испытаниям на аорте.



Рисунок 3. Ранение печени свиньи с нанесенным на нее местным гемостатическим средством

Брюшная аорта выделена на протяжении 6 см. На сосудистых зажимах пережата выше и ниже зоны доступа. Скальпелем произведена продольная аортотомия, длина разреза – 1 см. Рана осушена салфеткой. Дефект накрыт образцом пленки и прижат салфеткой. Зажимы сняты. Через 30 с отмечено плотное приклеивание образца к аорте и парааортальным тканям. Наблюдается устойчивый гемостаз. Контроль систолического давления – 110 мм.рт.ст..



Рисунок 4. Ранение аорты свиньи с нанесенным на нее местным гемостатическим средством

Перенос внимания на образец пленки на печени. Суммарно через 15 минут после аппликации наблюдается частичное размягчение образца, адгезия сохраняется. Кровотечения из дефекта печени не отмечено.



Селезёнка выведена в рану, отграничена салфетками. Скальпелем в средней трети органа иссечен дефект размерами 2x1,5x0,5см. Наблюдается обильное кровотечение. Дефект осушен салфеткой, после чего сразу же накрыт образцом пленки диаметром около 5 см и прижат салфеткой. Через 30 с наблюдается плотная адгезия по всей площади образца. Наблюдение в течение 20 минут. Кровотечение не продолжается. Адгезия сохраняется, подтекания крови не определяется.



Рисунок 5. Ранение селезенки свиньи с нанесенным на нее местным гемостатическим средством

Ход эксперимента №2:

При моделировании наружных ранений выполнен эксперимент в условиях полигона: под наркозом свинье нанесено огнестрельное ранение в область наружной поверхности правого бедра по траектории перпендикулярной поверхности кожи свиньи. В наружной поверхности бедра входное отверстие от пули, а области внутренней поверхности выходное отверстие от пули. Из области ран наблюдается обильное кровотечение. Рана осушена марлевой салфеткой, накрыта опытным образцом пленки, диаметром 10 см, прижата салфеткой. Экспозиция 30 с. Через 30 с хорошая адгезия пленки к ране и поверхности кожи. Кровотечения не наблюдается. Наблюдение в течение 10 минут для контроля гемостаза. На одиннадцатой минуте адгезия сохраняется без дополнительной фиксации пленки.



Рисунок 4. Огнестрельное ранение бедра свиньи с нанесенным на нее местным гемостатическим средством



Обобщенные результаты опытов представлены в.

Вид ранения	Печень	Аорта	Селезенка	Огнестрельное ранение бедра
Тяжесть кровотечения по шкале VibeScale	3 степень	4 степень	3 степень	4 степень
Начало устойчивого гемостаза после применения нового местного гемостатического средства в мин.	3,5	5	3,3	4,1

Обсуждение.

Ключевым компонентом разрабатываемого медицинского изделия является высокополимерный водонерастворимый хитозан. Для получения растворимой соли хитозана могут быть использованы органические или одноосновные неорганические кислоты, например, уксусная, молочная, янтарная, соляная и им подобные. В нашем случае предпочтительнее использовать уксусную кислоту, так как в процессе высушивания пленки ее избыток удаляется за счет испарения. Сушка маточного раствора хитозана до состояния сухой пленки выбрана потому, что влажный гидрогель не обладает достаточной адгезией: в этом случае нет плотного контакта положительно заряженных групп с поверхностью ткани. Напротив, использование сухой пленки приводит к тому, что в месте ее контакта с влажной поверхностью ткани происходит быстрая локальная дегидратация поверхности ткани, что обеспечивает плотный контакт между функциональными группами компонентов пленки и клеточной мембраной.

В состав активного (адгезивного) слоя пленки введен аргинин – положительно заряженная аминокислота, либо полиаргинин, представляющий собой положительно заряженную синтетическую полиаминокислоту [5]. В момент контакта с поверхностью раны происходит быстрая дегидратация ее поверхности и образование электростатических связей между положительно заряженными аминогруппами хитозана и гуаниновыми группами аргинина с отрицательно заряженными молекулами клеточных мембран. Благодаря именно гуанидиновой группе аргинина, являющейся однокислотным основанием (рКа 12,5) потенцируются адгезивные и гемостатические свойства хитозана. В качестве добавки может быть также использован протамина сульфат – небольшой природный белок из молок рыб с молекулярной массой 4,5 кДа, в котором 67% аминокислотного состава представлено аргинином. Множественные положительно заряженные аргининовые группы цепи протамина обеспечивают сильное электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными группами на клеточных мембранах. Пленка Хитозан/Аргинин продемонстрировала подавление роста колоний *E. Coli* и *S. Aureus*. Более того, по литературным данным, раствор хитозана и аргинина не проявлял цитотоксичности и способствовал клеточной пролиферации [6].

Хотя хитозан при высыхании и образует пленку, обладающую адгезивными свойствами, при контакте с влажной поверхностью ткани, однако, при избытке жидкости пленка вскоре набухает и переходит в желеобразное состояние, теряя свои адгезивные свойства. Поэтому необходимо усилить изделие дополнительным водостойчивым слоем (несущем), для чего была использована вторая (наружная) хитозановая пленка, модифицированная глицерином, добавление которого делает пленку водонерастворимой. Глицерин – органическое соединение, простейший представитель трёхатомных спиртов,



нетоксичен, в отличие от простейших двухатомных спиртов [7]. Несущий слой также, как и активный содержит ацетат хитозана в качестве основы, что делает пленку биологически инертной и позволяет оставлять ее на ране после завершения операции на паренхиматозных органах и сосудах.

В составе хитозановой пленки глицерин обеспечивает эластичность и нерастворимость несущего слоя без использования традиционных токсичных сшивающих агентов, например, глутарового альдегида.

Адгезивные свойства пленки и устойчивость к размоканию во влажной среде дополнительно усилены за счет добавления к слою, контактирующему с раной еще одного компонента – таннина, являющегося растительным полифенольным дубильным веществом, несущим тригидроксибензойные остатки, образующими прочные связи с клеточными белками и полисахаридами. Хорошая адгезивность таннина обусловлена его химической реакцией с нуклеофильными группами, такими как $-NH_2$ или $-SH$ на поверхности ткани. Добавление таннина к раствору обеспечило значительную силу адгезии к влажной ткани и хорошую цитосовместимость [8]. Биологические адгезивы на основе таннина обладают антиоксидантными, противовоспалительными и антибактериальными свойствами. Таннин может связывать свободные радикалы, а также способствовать пролиферации клеток млекопитающих. Противовоспалительные свойства таннина обусловлены его способностью вызвать снижение экспрессии интерлейкина 1В и фактора некроза опухоли альфа [9]. Таннин не обладает токсичностью, что было изучено при применении повязок, содержащих таннин у больных с обширными ожогами [10].

Таким образом, благодаря сочетанию адгезивных свойств с биологической инертностью и способностью к биодеградации местное гемостатическое средство можно использовать при ранениях паренхиматозных органов, таких как печень, почки и селезенка, как средство временного или окончательного гемостаза. После операции препарат может быть оставлен в брюшной полости на ране.

Заключение.

В рамках реализации госзадания разработано универсальное локальное высокоадгезивное гемостатическое средство в виде двухслойной композитной пленки на основе хитозана.

Произведен подбор компонентов новой гемостатической пластины, оптимизация соотношений разных ингредиентов, режимов смешивания и высушивания, анализ физико-химических свойств различных образцов пластины. Произведено сравнение различных пропорций химических веществ для придания гемостатическому средству необходимых свойств. В качестве добавок использованы такие вещества, как таннин, аргинин, протамина сульфат, глицерин и некоторые другие. После оценки различных комбинаций веществ получен прототип нового местного гемостатического средства.

Подобраны оптимальные условия смешивания и высушивания раствора для получения гемостатической пластины. При изготовлении раствора использован высокополимерный хитозан, растворенный в уксусной кислоте, так как ее избыток легко удаляется в процессе последующей сушки. Для изготовления пластины выбран метод сушки, так как влажный гидрогель не обладает достаточной адгезией ввиду того, что в этом случае нет плотного контакта положительно заряженных групп с поверхностями клеток.

В рамках настоящей работы создан один из прототипов нового местного гемостатического средства на основе производных хитозана, который выполнен в виде двухслойной пленки и содержит наружный несущий слой с повышенной механической прочностью и внутренний адгезивный слой для контакта с раной. Основой обоих слоев является ацетат хитозана с различными добавками, которые позволяют усилить



гемостатические свойства и адгезивность активного слоя пленки. В несущий слой для придания эластичности и устойчивости к размоканию введен глицерин. Произведена оценка гемостатических и адгезивных свойств образцов пластины. Внесение аргинина и танина в композитные пленки позволяет улучшить адгезивные свойства, не увеличивая при этом количество побочных эффектов, а наличие подложки увеличивает прочность пленок и устойчивость к размоканию во влажной среде.

Разработанная композиция для местного гемостаза обладает такими достоинствами как:

- универсальность использования: эффективны как раневые повязки и средства для интраоперационного гемостаза при работе с паренхиматозными органами;
- могут использоваться интраоперационно при ранениях печени, почек, селезенки и крупных сосудов, как средство временного или окончательного гемостаза;
- применимы в качестве раневого гемостатического адгезива при наружных ранах;
- при необходимости отделяются от раневой поверхности без дополнительной травматизации ткани.

Новое местное гемостатическое средство за счет отличных адгезивных свойств позволяет использовать его без фиксации с помощью повязки, а также при ранениях внутренних паренхиматозных органов и крупных сосудов.

При использовании препарата на наружных ранах его несомненным достоинством является легкость удаления пластины с раневой поверхности: пластина, в отличие от бинта, сохраняет свою эластичность после высыхания крови и удаляется одним движением, не причиняя значительных болезненных ощущений.

Работа выполнена в рамках государственного задания №123020800165-4 «Разработка медицинского изделия – новое локальное гемостатическое средство с повышенной адгезией для внутрисполостного использования – биodeградируемая поликомпонентная пленка» Министерства Здравоохранения РФ.

Список литературы:

1. Song F, Kong Y, Shao C, Cheng Y, Lu J, Tao Y, Du J, Wang H. Chitosan-based multifunctional flexible hemostatic bio-hydrogel. *Acta Biomater.* 2021 Dec;136:170-183. doi: 10.1016/j.actbio.2021.09.056. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34610476
2. Овсянников В.Г., Торопкина Ю.Е., Краскевич В.В., Алексеев В.В., Бойченко А.Е., Алексеева Н.С., Краскевич Д.А. Лизоцим – грани возможного// *Современные проблемы науки и образования.* – 2020. – № 3.
3. Di Martino, A. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. Di Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud // *Biomaterials.* –2005. – Vol. 26, № 30. – P. 5983–5990.
4. Da Sacco, L. Chitin and chitosan as multipurpose natural polymers for groundwater arsenic removal and AS2O3 delivery in tumor therapy / L. Da Sacco, A. Masotti// *Mar. Drugs.* – 2010. – Vol. 8, № 5. – P. 1518–1525.
5. Fuchs SM, Raines RT. Polyarginine as a multifunctional fusion tag. *Protein Sci.* 2005 Jun;14 (6):1538-4.
6. Song J, Feng H, Wu M, Chen L, Xia W, Zhang W. Preparation and characterization of arginine-modified chitosan/hydroxypropyl methylcellulose antibacterial film. *Int J Biol Macromol.* 2020 Feb 15;145:750-758. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.141. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31857168.
7. Титов, В. Н. Единение физико-химического и биологического действия спиртов глицерина и холестерина в поглощении клетками жирных кислот.// *Клиническая лабораторная диагностика: журн.* – 2013. – № 1.



8. Guo J, Sun W, Kim JP, Lu X, Li Q, Lin M, Mrowczynski O, Rizk EB, Cheng J, Qian G, Yang J. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. *Acta Biomater.* 2018 May; 72:35-44. doi: 10.1016/j.actbio.2018.03.008. Epub 2018 Mar 17. PMID: 29555464; PMCID: PMC6328059.

9. Wu K, Fu M, Zhao Y, Gerhard E, Li Y, Yang J, Guo J. Anti-oxidant anti-inflammatory and antibacterial tannin-crosslinked citrate-based mussel-inspired bioadhesives facilitate scarless wound healing. *Bioact Mater.* 2022 May 21;20:93-110. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.05.017. PMID: 35633874; PMCID: PMC9131258.

10. Chokotho L, van Hasselt E. The use of tannins in the local treatment of burn wounds – a pilot study. *Malawi Med J.* 2005 Jun;17 (1):19-20. doi: 10.4314/mmj.v17i1.10866. PMID: 27528993; PMCID: PMC3346037.

