

УДК: 616-001-002.16-005.1-089.811/.814-083.98(047.31)

КП

№ держреєстрації 0116U006817

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет
(СумДУ)

40007, Україна, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, тел. (0542) 33 41 08

ЗАТВЕРДЖУЮ

проректор з наукової роботи

д.ф.-м.н., професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Розроблення та дослідження засобів місцевого призначення з гемостатичними властивостями для невідкладної допомоги та хірургії
ВИЗНАЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ГЕМОСТАЗУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ В ПАРЕНХІМАТОЗНИХ ОРГАНАХ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ХІТОЗАНОВИХ ГУБОК (проміжний)

Начальник НДЧ

к.ф.-м.н., с.н.с.

Д.І. Курбатов

Керівник НДР

д.мед.н., доцент

М.В. Погорелов

2016

Рукопис закінчено 26 грудня 2016 року

Результати роботи розглянуто науковою радою,

протокол від 2016.11.24, № 3

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, д.мед.н., доцент, завідувач кафедри гігієни та екології	2016.12.23	М.В.Погорєлов (вступ, розділи 1 та 5)
м.н.с., кафедри гігієни та екології	2016.12.23	В.М. Дейнека (розділ 3)
д.вет.н., м.н.с. кафедри гігієни та екології	2016.12.23	О.М. Бергілевич (розділ 1.2)
Аспірант кафедри гігієни та екології	2016.12.23	Є.В. Гусак (розділи 1.1, 1.3)
Магістрант медичного інституту	2016.12.23	К.М. Дейнека (розділ 2)
Аспірант Кафедри гігієни та екології	2016.12.23	А.В. Гапченко (розділ 4)
Студентка медичного інституту	2016.12.23	К.А. Дєдкова (розділ 4)
Студент медичного інституту	2016.12.23	Е.В. Козик (розділ 2)
Студентка медичного інституту	2016.12.23	А.Ф. Юсупова (розділ 3)
Студентка медичного інституту	2016.12.23	Ю.А. Гура (розділ 4)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 38 с., 8 рис., 53 джерел.

Об'єкт дослідження – гемостаз при травмі периферичних судин середнього та великого діаметру а також при ушкодженні паренхіматозних органів.

Мета роботи – створення вітчизняних засобів медичного призначення для екстреної зупинки кровотечі в умовах військових дій, техногенних катастроф, промислових та дорожньо-транспортних аварій а також гемостатичних засобів для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів в умовах операційної.

Методи дослідження – органічний синтез, blood-clotting test, растрова електронна мікроскопія.

В основу гіпотези наукової розробки покладені відомості про наявність гемостатичних властивостей деяких похідних хітозану. Для перевірки гіпотези нами створена лінійка гелей з хітозану різної молекулярної маси з використанням різних розчинників (ацетат, аскорбінова, молочна кислоти). З гелей шляхом ліофільного висушування формувались губки, гемостатичні властивості яких перевірялись методом blood-clotting тесту. В результаті виконання етапу були розроблені моделі кровотечі з судин великого діаметру та паренхіматозних органів, які дозволять проводити відтворюваний експеримент з дослідження гемостатичної активності засобів медичного призначення. Доведено, що сорбція рідкої частини крові не має залежності від виду матеріалу з хітозану, в той час як молекулярна маса хітозану суттєво впливає на процеси тромбоутворення. Матеріали з молекулярною масою 200 кДа викликають адгезію тромбоцитів на поверхні зразків та активують їх, що виявляється у зміні форми елементів крові. Доведено, що механізм кровозупинної дії хітозану також полягає у зміні проникності мембрани еритроцитів, що призводить до зміни їх форми та утворенню сфероцитів з наступною їх агрегацією.

КРОВОТЕЧА, ХІТОЗАН, ГЕМОСТАТИЧНІ МАТЕРІАЛИ, ЗУПИНКА КРОВОТЕЧІ, ЗАСОБИ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ.

ЗМІСТ

Вступ.....	5
1 Огляд літератури	
1.1 Класифікація гемостатичних засобів	7
1.2 Гемостатичний ефект хітозану	10
1.3 Хітозанові пов'язки – застосування у сучасній практиці	12
2 Матеріали та методи дослідження	14
3. Розробка корисної моделі	18
4 Результати дослідження	22
5 Обговорення результатів дослідження	28
ВИСНОВКИ	32
Перелік посилань.....	33

ВСТУП

Належний гемостаз після травми та хірургічних операцій є великою проблемою в сучасній медицині. Близько 40 % травматичних і більше 90% бойових втрат припадає на догоспітальний етап. Приблизно 50% з цих втрат були зареєстровані із-за масивної крововтрати [36]. Так, біля 80% цивільних травм з летальним закінченням в Сполучених штатах викликано саме неконтрольованою кровотечею [42]. Також, кровотеча у травматологічній практиці є провідною причиною повторної операції [29].

Місцеве кровоспинне лікування застосовується з давніх часів. Для цього використовували трави, суміш воску, жиру і ячмінь, а також шкури тварин у поєднанні з гарячим піском [43]. Прогрес у біотехнології спричинив вибуховий ріст у сфері місцевих гемостатичних агентів протягом останніх двох десятиліть. [4, 18, 45].

В даний час наукове співтовариство активно шукає матеріали, які ефективно зупиняють кровотечу без побічних ефектів. Особлива увага приділяється матеріалам на основі природних полімерів (колаген, хітозан та інші) [30б 41].

Гемостатичні пов'язки з хітину і хітозану найбільш перспективні у зв'язку з ефективною зупинкою кровотечі і додатковими властивостями, як то антибактеріальні та стимуляція регенерації. Хітозан є лінійним, напівкристалічним полісахаридом, що складається з (1-4) -2-ацетамідо-2-дезоксі-ВD-глюкана (N-ацетил-глюкозаміну D) і (1-4) -2-аміно-2-дезоксі-D-глюкана (D-глюкозаміну) [44]. Він не широко присутній у навколишньому середовищі - однак, він може бути легко отриманий шляхом часткового деацетилювання з природного полімеру хітину. Для того щоб назватися "Хітозан", деацетілірований хітин повинний містити принаймні 60% D-глюкозаміних залишків [13]. Молекулярна маса хітозану зазвичай становить від 300 до 1000 кДа, залежно від вихідної речовини і приготування. Хітин і хітозан є біосумісними полімерами, але є деякі свідчення того, що хітозан більш цитосумісний *in-vitro*, ніж хітин. Матеріали на основі хітозану не мають алергічного ефекту і є не токсичними [35].

Найбільш вивченими гемостатичними матеріалами на основі хітозану на сьогоднішній день є Celox і HemCon. Обидві пов'язки були вивчені експериментально та показали високу клінічну ефективність [12, 20, 33].

Різні форми гемостатичних матеріалів на основі хітозану (піни, губки, плівки і т.д.) розроблені, але їх виробництво коштує дорого. Один з найпростіших способів щоб отримати кровоспинні матеріали це просочення бавовняної (або іншої) марлі або бинта в хітозані, щоб поліпшити їх кровоспинні властивості. Клінічні та експериментальні оцінки гемостатичних матеріалів на основі хітозану говорять про їх високу ефективність і безпечність застосування в цивільних і військових умовах [31, 41]. Але ще не вивчено як молекулярна вага хітозану впливає на гемостатичну активність матеріалів. Також, хітозан може бути присутнім в різних концентраціях, що може змінити ефективність і час необхідний для зупинки кровотечі.

Хітозан може мати різну молекулярну вагу, ступінь деацетилювання і може бути хімічно змінений. Також можна зробити різні фізичні форми: гелі, піни, плівки, губки та інше, що збільшить потенціальне число матеріалів на основі хітозана з різними фізичними, хімічними і біологічними властивостями. Хітозан та його похідні широко використовуються для біомедичного застосування у зв'язку з антиокислювальними, протизапальними, антимікробними властивостями та здатністю до регенерації тканин. Але вплив різної молекулярної маси і концентрації хітозану на біологічну відповідь клітин крові досі не з'ясовано [11, 31].

Виконання проекту може в перспективі мати важливе практичне значення, оскільки на підставі отриманих даних можлива розробка ефективних засобів медичного призначення для використання з метою зупинки кровотечі з поранених судин та паренхіматозних органах як в умовах цивільної, так і військової хірургії.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація гемостатичних засобів

Hardean E. Achnek поділив всі місцеві гемостатичні агенти на декілька груп: фізичні агенти, абсорбуючі агенти, біологічні агенти, синтетичні агенти та гемостатичні пов'язки [17].

Фізичні агенти – «кістковий віск» та *ostene* забезпечують гемостаз через закупорку каналів кровотечі в кістках та подальшим тампонуєвим ефектом. Кістковий віск легкий у використанні, зупиняє кровотечу майже миттєво та має низьку ціну в порівнянні з іншими гемостатичними агентами. Але він не поглинається тілом, натомість, він заважає остеогенезу і, таким чином, перешкоджає загоювання кістки. Також є багато свідчень про формування гранулом та виникнення інфекцій після застосування кісткового воску [5, 28, 46]. *Ostene* є біосумісною альтернативою кістковому воску, що не перешкоджає росту кістки, не змінюється людським тілом та виводиться без змін у будові [1]. Він також зменшує ризик інфекційних ускладнень в експериментальній моделі [27]. Проте до сьогодні не було проведено жодних рандомізованих досліджень з вивчення його ефективності та безпеки.

Абсорбуючими агентами є желатинові піни, оксидована целюлоза, мікрофібрилярний колаген, що використовується з 1945 року для гемостазу [49]. Желатинова піна ефективно контролює кровотечу з малих судин та може застосовуватися для гемостазу в кістках [51]. Вона не антигенна та повністю абсорбується тілом через 4-6 тижнів, що дозволяє її використання в хірургії. Також, нейтральний рН дозволяє використовувати її з біологічними агентами. Але, вона не повинна використовуватися в закритих місцях, адже значне набухання може стиснути нерви та викликати закупорку при потраплянні до внутрішньосудинних відсіків. Оксидована целюлоза має дуже гарні характеристики користування та не адгезується до поверхні хірургічних інструментів. Як желатин, вона розчиняється за 2-6 тижнів. Низький рН надає целюлозним матеріалам антибактеріальних властивостей. Тим не менш, низький рН може викликати запалення оточуючих

тканей та не дозволяє використання з іншими гемостатичними агентами [25]. Мікрофіблярний колаген (MFC) був розроблений у 1970р. та забезпечує більшу площу поверхні, що, при контакті з кров'ю, дозволяє тромбоцитам приставати до його фібрил. За активацією тромбоцитів слідує агрегація тромбоцитів та формування тромбу. Гемостаз зазвичай досягається протягом 2-5 хвилин. Так як механізм дії MFC залежить від активації тромбоцитів, він менш ефективний в пацієнтів з тяжкою тромбоцитопенією, але успішно досягає гемостазу навіть при сильній гепаринізації.

Біологічні агенти є найбільш ефективними для зупинки кровотечі через їх гемостатичну природу. До цієї групи входять місцевий тромбін, фібриновий клей та тромбоцитний гель. Тромбін це ензим природного походження, що відіграє провідну роль в процесі гемостазу, запаленні та клітинній взаємодії [7]. Тромбін був очищений з великої кількості джерел та використовувався як засіб для місцевого гемостазу протягом більш ніж 60 років. До недавнього часу єдиним комерційно доступний чистий тромбін отримували з бичачої плазми, тому він міг викликати сильну імунну реакцію. Тепер людський рекомбінований тромбін є доступним та показує відносну ефективність, схожий профіль безпеки та набагато меншу імунну реакцію аніж бичачий тромбін [2]. Фібринові пломби використовувалися для гемостазу, пересадки шкіри та лікування кісток починаючи з 1960-х років. У 1989 передбачуване рандомізоване клінічне дослідження фібринового клею порівняно зі звичайними місцевими гемостатичними агентами у пацієнтів з поаторною операцією на серці або екстреною стернотомією виявило значно швидше встановлення контролю над кровотечею та зменшення післяопераційної крововтрати. [40]. Ці пломби залишаються ефективними у гепаринізованих пацієнтів, що дозволяє їх використання в кардіохірургії. Але перед їх нанесенням на рани потрібно очистити від антисептиків, до складу яких входить спирт, йод або іони важких металів, що можуть денатурувати застосований тромбін та фібриноген, що обмежує їхнє використання в екстрених випадках [39]. Вважається, що власна плазма, що містить фібриноген та тромбоцитів, що складаються з мікрофібрилярного колагену та тромбіну покращує міцність тромбу та забезпечує

фактори росту для подальшого укріплення тромбу [34, 45]. Але цей метод потребує попередньої обробки матеріалу перед застосуванням та не використовується з метилметакрилатом або будь-якими іншими акриловими склеючими засобами.

Синтетичні агенти включають цианоакрилати, гідрогель поліетиленгліколю та глютаральдегід-зв'язаний альбумін. Цианоакрилати – рідкі мономерні, що швидко формують полімери в присутності води і таким чином швидко склеюють прилеглі поверхні, були винайдені у 1942 р. Вони використовуються як заміник швам (≤ 5.0) при порізах на обличчі, кінцівках та торсі і формують захисний бар'єр, що не пропускає воду [52]. Але їх використання утруднено при рваних ранах та не повинні використовуватися для вкушених, колотих або розчавлених ран. Вони також не рекомендовані на слизових поверхнях, пахвах або промежині, що значно обмежує їх застосування [38]. Поліетилен гліколь є добрим механічним герметиком для реконструкції судин, він не є екзотермічним, тому не викликає запалення та не підсилює бактеріальні інфекції. Поліетилен гліколь також є корисним для запобігання склеюванню перикарду у пацієнтів, що можуть потребувати багатоетапної операції на серці і, таким чином, багаторазових стернотомій, особливо у дітей, що страждають вродженою вадою серця [26]. Єдиною проблемою може бути те, що він може набувати об'єму у 4 рази більше за початковий лише за перший день після нанесення та продовжує набухати ще більше після цього. Тому, його не варто використовувати для оточення анатомічних структур, що можуть бути пошкоджені компресією [9]. Глютаральдегід-зв'язаний альбумін використовують для закриття дір біля швів або скоб, є добрим засобом для зупинки артеріальної кровотечі [53]. Він найчастіше використовується у важких кардіоваскулярних процедурах, що торкаються аневризми аорти, заміни клапану та розшарування аорти, як і в периферійних васкулярних процедурах, таких як каротидна ендартеректомія та артеріовенозний доступ [10]. Але він повинен використовуватися з обережністю через мутагенні ефекти глютаральдегіду та можливу реакцію гіперчутливості. Також його не варто наносити навколо структур, що знаходяться у стані розвитку, адже він може пошкодити їх ріст.

Гемостатичні пов'язки є найбільш використовуваними засобами для місцевого гемостазу через свою ефективність та легкість використання. Сухі фібринові пов'язки були дуже успішні в дослідженнях на тваринах. Було показано, що додавання ліофілізованого фібрinогену та тромбіну до марлевих пов'язок зменшує крововтрату через артеріальну кровотечу у свиней, так само як і артеріальну, венозну та стегнову кровотечу у кіз та дифузну кровотечу кіз викликану вогнестрільною раною верхніх кінцівок [4, 20]. До обмежень входить крихкість (викликає необхідність твердого захисного пакування) так само як і вартість від 500 до 1000 доларів за квадрат площею 4x4 дюйми (10,16x10,16 см) [23]. Пов'язки з мінералом цеолітом є дуже ефективними при кровотечі з малим тиском, та показують меншу ефективність у інших випадках.

Хітинові та хітозанові гемостатичні пов'язки є найбільш багатообіцяючими через ефективне зупинення крові та можливі додаткові властивості, такі як антибактеріальна дія та стимуляція регенерації. Наразі є більше 10 комерційно доступних пов'язок на основі хітозану що широко використовуються як у воєнно-польовій, так і в громадянській медичній допомозі.

1.2 Гемостатичний ефект хітозану

Специфічний механізм дій хітозану залишається невідомим але інформація надає три можливих способи контролювати кровотечу: 1) сорбція плазми, 2) коагуляція еритроцитів, 3) адгезія тромбоцитів, агрегація та активація.

Сорбція плазми є ключовим фактором в застосуванні хітозану як гемостатика. Хітозан може абсорбувати від 50 до 300% рідини від його початкової ваги, що призводить до концентрації еритроцитів та тромбоцитів у пошкодженому місці. Темп сорбції залежить як від молекулярної маси та ступеню дезацетилювання, так і від типу хітозанового матеріалу. Молекули води, абсорбовані активними центрами полісахаридів збільшують темп сорбції у хітозану високого ступіню дезацетилювання. Ліофілізація або заморожувальне гелеутворення також покращує

сорбцію. Тим не менш, сорбція не є основним фактором, що може зупинити кровотечу.

Коагуляція еритроцитів напряму пов'язана з гемостатичними властивостями. Коагуляція еритроцитів підвищується в присутності хітозану через поєднання еритроцитів. Вони зв'язуються до купи полімерними ланцюгами хітозану та реполімерізуються формуючи сітку, потрапляючи до якої захоплені клітини формують штучний тромб [8]. Контакт хітозану з кров'ю призводить до змін в морфології еритроцитів. Вони втрачають типічну двовігнуту будову [47]. de Lima та ін. показали, що низький рівень рН нейтралізації цього розчину спричиняє високий рівень гемаглютинації [22]. Хітозан може напряму спричинити адгезію еритроцитів зовсім без формування будь-яких просторових сіткових структур або адгезування протеїнів плазми. Він також абсорбує фібриноген та інші плазматичні протеїни, що поліпшує адгезію еритроцитів та коагуляцію в поєднанні з хітозаном. Fan W. показав, що молекулярна вага хітозану може напряму зціплюватись з оболонками еритроцитів через свої катіонні властивості, що може бути основним механізмом гемаглютинації [21]. Але вплив хітозану на еритроцити, перешкоджаючий втрату сформованого тромбу може пояснити лише частину його гемостатичної функції.

Основна причина гемостатичної дії хітозану пов'язана з адгезією, агрегацією та активацією тромбоцитів. Було продемонстровано, що хітозанові плівки можуть покращити адгезію, агрегацію та активацію внутрішнього згортання крові [15]. Shen E.C. та ін. довели, що агрегація відноситься до концентрації тромбоцитів у плазмі [42]. Також наявна інформація, що хітозан діє ефективніше, аніж хітин для агрегації тромбоцитів. Основані на морфологічному досліді під скануючим електронним мікроскопом, тромбоцити були сильніше приєднані до поверхні хітину та хітозану у більш довгому процесі. Тромбоцити приєднувались та кріпились один до одного, формуючи агреговану масу неправильної форми. [6] Також хітозан може генерувати міжклітинні сигнальні реакції, що активують глікопротеїн IIb/IIIa та вивільнення тромбоксану A₂/ADP. Ці сигнали поліпшують поширення тромбоцитів, посилюють стабільність адгезії [32]. Виявлено, що підвищений рівень інтегрину $\alpha 2\beta 3$ експерсується тромбоцитами, присталими до хітозану [48]. Та останнім механізмом,

що асоціюється з адгезією тромбоцитів, пов'язаний з об'єднанням кальцію з молекулою хітозану, що спричиняє активацію актинового цитоскелету присталих тромбоцитів [37].

Підсумовуючи гемостатичні механізми матеріалів на основі хітозану, можна припустити, що по першу чергу сорбція плазми призводить до концентрації клітин крові у пошкодженому місці. В той же час, коагуляція еритроцитів та склеювання та агрегація тромбоцитів призводять до швидкого формування тромбу без систематичної активації гемостазу.

1.3 Хітозанові пов'язки – застосування у сучасній практиці

Найбільш вивченими кровоспинними пов'язками на основі хітозану є Celox та HemCon. Обидва перев'язувальні матеріали були оцінені експериментально та показали високий рівень ефективності. Доведено, що HemCon викликає гемостаз в середньому від 6.9 ± 3.9 хвилин проти 10.8 ± 2.8 хвилин для стандартної компресії в гепаринізованій вівці. Також автори довели меншу кількість гематом та відсутність ускладнень протягом застосування HemCon. Він має ефективні властивості як насичений тромбоцитами фібрин в зубній хірургії. Mark A. Brown пропонує, що пов'язка HemCon – це ефективний ад'юнкт для неконтрольованого екстреного крововиливу до традиційних заходів, такі як жгути та марлеві пов'язки у медичному обслуговуванні в цивільній лікарняній системі [31]. Пов'язки HemCon також утворюють антибактеріальний бар'єр проти широкого діапазону мікроорганізмів. Спеціальний звіт «HemCon Current Combat Operations» показує велику ступінь ефективності пов'язок на основі хітозану. В 62 (92%) випадків пов'язка HemCon повністю зупиняла чи значно зменшувала кровотечу. Було лише два випадки, коли пов'язка не змогла зупинити чи сповільнити кровотечу. В обох випадках пов'язка була розташована сліпо на порожнинні рани [3].

Celox це ще одна ефективна пов'язка для лікування тяжких кровотеч. На тваринних моделях показане повне зупинення кровотечі в усіх випадках порівняно з HemCon та QuikClot та подовження часу життя тварин [12]. Інша модель

статистично показує значні відмінності в часі кровотечі між Celox та контрольним зразком та між TraumaDEX і контрольним зразком, але не виявлено статистичних відмінностей в часі зупинки кровотечі між Celox та Trauma Dex. Özlem Koksal вивчав кровоспинну ефективність Celox на щурах під гіпотермією або застосуванням варфаріну. Гемостаз було досягнуто в 4 з 8 щурів у групі з нормотермією + стандартна пов'язка (50%), в той час як його було забезпечено у всіх щурів в групі з використанням Celox (100%). В групах, у яких було застосовано терапію варфарином, контроль над кровотечею був встановлений тільки у 2 з 8 щурів в при застосування стандартної схуми, проте це було вдалим в усіх щурів при використанні Celox. Ці результати показують високу ефективність Celox в різних станах, і навіть в стані коагуючої патології [24].

Таким чином, клінічна та експериментальна оцінка кровоспинних пов'язок на основі хітозану показує їхню високу ефективність та безпеку в цивільних та військових застосуваннях.

2 Матеріали та методи дослідження

Матеріали.

В рамках нашого дослідження ми використовували хітозан з молекулярною вагою (MW) 200, 500 і 700 кДа і ступенем деацетилювання 80-82% (Bioprogress, Moscow). Для просочення марлі хітозановим розчином використовували 1% оцтову кислоту з різною концентрацією (2, 3, 5%) хітозану. Використовуючи ці розчини, ми зробили наступні матеріали з потенціальною гемостатичною активністю:

1. Хітозанова марля (G-Ch)

Десять шарів марлі були просякнуті в розчині хітозану в співвідношенні 1 до 5. Марлі сушили в термостаті протягом 24 год при температурі 36 ° С. В кінці ми отримали 3 різні групи зразків:

а) G-Ch з молекулярною вагою (MW) 200 кДа з хітозановою концентрацією 2 %, 3 % і 5 %;

б) G-Ch з молекулярною вагою (MW) 500 кДа з хітозановою концентрацією 2 %, 3 % і 5 %;

в) G-Ch з молекулярною вагою (MW) 700 кДа з хітозановою концентрацією 1% і 2 %. (1% розчин хітозану з MW 200 і 500 кДа недостатньо в'язкий , щоб зробити пов'язку, в той час як 3% і 5% розчин 700 кДа хітозана надто в'язкий для просякнення марлі)

2. Стандартна марлева пов'язка (SGD)

Десять шарів стандартної бавовняної марлі були використані в якості контролю. Всі зразки були вирізані так, щоб зробити тонку смужку з середньою вагою 100 мг. Перед експериментом всі матеріали зберігали в холодильнику з температурою 4 °С.

Скануюча електронна мікроскопія

Скануючу електронну мікроскопію проводили з використанням електронного мікроскопа REMMA102 (SEIMI, Україна) для отримання інформації про розподіл хітозану на поверхні бавовни. Щоб уникнути накопичення заряду на поверхні зразків, бавовняну марлю і хітозанові матеріали ми покрили тонким (30-50 нм)

шаром срібла у вакуумній кстановці VUP- 5M (SELMI, Україна). Для отримання інформації про взаємодію між клітинами крові і матеріалами, які ми використовували в експерименті, після гемостазу ми фіксували SCG і G-Ch в 5% формальдегіді протягом 1 год, зневоднювали зразки в етанолі і просушували.

Забір крові

В Медичному інституті Сумського державного університету медичною сестрою була взята кров в об'ємі 80 мл у трьох волонтерів. Дослідження було схвалене Етичним комітетом медичного інституту Сумського державного університету. Відповідну інформовану згоду було отримано від усіх волонтерів. Суб'єкти були здорові дорослі у віці 20, 22, і 24 роки.

2.5 мл крові відразу було розміщено в Becton Dickinson Vacutainers® з 3,6 мг ЕДТА для повного аналізу крові (CBC) і з 0,109 М цитрату натрію – для тесту коагулограми. 20 мл крові центрифугували, щоб зробити еритроцитарну масу для тесту аглютинації.

Аглютинація еритроцитів

Брали 5 мл еритроцитів та розводили у 95 мл фізіологічному розчині. 0,5 мл розчину хітозану перемістили на дно 96- лункового мікропланшета і додали 0,1 мл 5% еритроцитарної маси. Витримували в термостаті при температурі 37 °C протягом 40 хв. Гемаглютинацію описували використовуючи шкалу, запропоновану Ставицьким:

- ++++ Щільна зерниста аглютинація;
- +++плоска поверхня на дні з добре згорнутими краями;
- ++плоска поверхня на дні. Краї трохи обірвані;
- + Вузьке червоне кільце навколо краю гладкої поверхні;
- Окремий червоний гудзик в центрі дна.

Blood clotting test

Смужки матеріалу на основі хітозану і стандартної бавовняної марлі з вагою 100 мг помістили в Becton Dickinson Vacutainers® і витримували в термостаті при температурі 36 ° C протягом 10 хв. Всі зразки були видалені і кров перемістили до гематологічних тестів. Необроблена кров була використана в якості контролю.

Сорбція крові

Всі зразки видалені з Becton Dickinson Vacutainers® з людською кров'ю зважували, щоб оцінити сорбцію крові. Сорбційна здатність була вирахована з використанням наступної формули (1):

$$S = W1 - W2 \quad (1)$$

де S - сорбція крові (мг);

W1 - вага зразка після експерименту (мг);

W2 - вага зразка, до експерименту (мг).

Загальний аналіз крові (CBC-тест)

CBC-тест і коагулограма були проведені в Медичному центрі "Флоріс". CBC-тест здійснювали за допомогою гематологічного аналізатора CELL-DYN 3700 (Abbott, США), використовуючи реагенти DIAGON (Угорщина). Ми визначили рівень гемоглобіну (HGB, g/L), еритроцитів (RBC, T/L), середній об'єм еритроцитів (MCV, fL), відсотковий вміст еритроцитів (RDW, %), тромбоцити (PTL, G/L), середнє об'єм тромбоцитів (MPV, fL), і середня ширина тромбоцитів (PDW, %). Вивчення згортання крові проводили на автоматизованій системі ACL 7000 (Instrumentation Laboratory, USA) з використанням реагентів RecombiPlasTin 2G і SynthASil (HemosIL, США). Ми визначили протромбіновий час (PT, sec), протромбіновий індекс (PI, %), міжнародне нормалізоване відношення (INR, EU), фібриноген (Fg, gram per liter), і частково активований тромбопластиновий час (APTT, sec).

Експеримент in- vivo

Двадцять білих лабораторних щурів (лінії Вістар) масою 180-200 г, отриманих з віварію Медичного інституту Сумського державного університету, були використані в дослідженні. Експеримент був схвалений Комітетом з етики Сумського державного університету. Щурів розділили на дві групи по 10 тварин в кожній. Всі тварини були знеболенні кетаміном (10 мг на 1 кг ваги). Місце доступу у кожної тварини були поверхневі стегнові артерії (ПСА). Ми розрізали медіальну поверхню ПСА на половину від її діаметру за допомогою хірургічних ножиць. У першій групі тварин ми застосовували стандарту бавовняну марлю (SGD) зі

стандартним ручним натисненням (SMC) для контролю кровотечі. Другу групу піддавали лікуванню прикладанням G-Ch та застосовували ручну компресію. В обох групах ручне натиснення застосовували впродовж 60 с, якщо кровотеча продовжувалась, додавали ще 60 с. Якщо гемостаз не був досягнутий після 10 хв обробки, то процедуру зупинки кровотечі завершали. Після гемостазу ми зважували SGD і G-Ch, щоб отримати інформацію про кількість крововтрати, що було визначено за допомогою наступної формули (2):

$$S = W1 - W2, (2)$$

де S - втрата крові (мг);

W1 - вага зразка після експерименту (мг);

W2 - вага зразка до експерименту (мг).

Статистичний метод

Всі цифрові дані записували як середня величина \pm похибка середньої величини ($M \pm m$). Достовірність різниці між цифровими даними вираховували за допомогою t-критерію Стьюдента з використанням програми SPSS-Statistic 21.0 (trial-version).

3 Розробка корисної моделі

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема до місцевих гемостатичних матеріалів, що дозволяють зупинити кровотечу з пошкоджених паренхіматозних органів, таких як печінка, селезінка, нирки, як під час невідкладних оперативних втручаннях так і для забезпечення надійного гемостазу в умовах планової чи ургентної хірургії, гінекології, урології, травматології при виконанні відкритих чи ендоскопічних втручань.

Відомий матеріал для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів «Губка гемостатична» ТОВ Біофарма Плазма, Україна (Номер реєстраційного посвідчення: UA/5711/01/01) в основі якої є висушена донорська плазма з фібрином. Донорські фактори згортання крові та фібрин дозволяють пришвидшити утворення тромбу в ділянці пошкодження паренхіматозного органу.

Але даний матеріал має вагу 0,8 г, що робить його не ефективним за умов значної кровотечі, до того ж донорські компоненти крові несуть в собі ризик зараження вірусними та пріонними захворюваннями. Також можливі імунні реакції на компоненти гемостатичної губки. Амбен (4-(амінометил) бензойна кислота), інгібітор фібринолізу, що є допоміжною речовиною гемостатичної губки, протипоказаний для застосування у вагітних, та має ряд побічних ефектів таких як, алергічні реакції, диспепсичні розлади шлунково-кишкового тракту, порушення роботи серцево-судинної системи, катаральні явища з боку дихальної системи.

Відомий матеріал зупинки кровотечі з паренхіматозних органів із застосуванням засобу місцевого призначення «Surgicel»® Eticon, (патент США. US 8,815,832 B2., US 4,626,253.) який містить в якості активної речовини окиснену целюлозу, що дозволяє швидко сорбувати рідку частину крові та концентрувати формені елементи крові навколо місця ураження. Проте використання даного матеріалу призводить до значного зниження рН у місці застосування, що може викликати хімічне пошкодження оточуючих тканин, утворення прозапальних цитокінів та появи запальної реакції. Крім того, навколо гемостатичного матеріалу

«Surgicel®» може виникати гранульоматозне запалення, що у деяких випадках призводить до утворення абсцесу.

Відомий також матеріал зупинки кровотечі з паренхіматозних органів із застосуванням препарату «TachoComb»® Nycomed Austria GmbH, (патент США US 6733774 B2), що містить колаген з сухожилків коня, ліофілізований фібриноген людини, тромбін з крові бика, апротинін з легенів бика. Зупинка кровотечі здійснюється шляхом аплікації пластини на ранову поверхню. При контакті з кров'ю з пластини вивільнюються тромбін, що перетворює фібриноген у фібрин, апротинін перешкоджає передчасному фібринолізу плазміном. «TachoComb» склеюється з рановою поверхнею і утворює водо- та повітряно непроникний шар.

Проте використання алогенних компонентів в даному гемостатичному матеріалі несе ризик зараження вірусними та пріонними захворюваннями. Білки тваринного походження можуть призвести до алергічної реакції у вигляді, ангіоневротичного набряку, кропивниці чи анафілактичного шоку, особливо при повторному застосуванні. Використання пластин TachoComb може призвести до загальних проявів у вигляді нудоти, блювання, відчуття здавлювання в грудях, бронхоспазму, артеріальної гіпотензії, тахікардії гіпертермії. У разі попадання препарату внутрішньосудинно можливий розвиток тромбоемболії, Також можлива місцева реакція у вигляді відчуття печіння у місці застосування.

В основу корисної моделі покладено, що для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів використовується ліофільно висушена губка на основі хітозану, яка повністю зупиняє кровотечу, зручна у використанні, не впливає на оточуючі тканини, не викликає розвитку системних ускладнень, має незначну собівартість для промислового виробництва та може використовуватись, як у плановій так і невідкладній хірургії, гінекології, урології, травматології при виконанні відкритих чи ендоскопічних втручань.

Поставлене завдання вирішується тим, що за основу використовується розчин хітозану у вигляді гелю з концентрацією діючої речовини від 0,5% до 5% і молекулярною масою від 100 до 700 кДа. Для створення гелю хітозану можливе використання насичених або ненасичених карбонових, дикарбонових чи

трикарбонних кислот, таких як ацетоянтарна, аскорбінова, гліколева, глутарова, діацетилвинна, дігліколева, лимонна, малеїнова, малонова, метакрилова, метилянтарна, молочна, пропіонова, пропанова, саліцилова, фумарова щавлева, бурштинова, їх ангідриди, їх галоїдангідриди, дігалоїдангідриди, або їх альдегіди, чи діальдегіди, або їх і ефіри. Отриманий гель хітозану який заморожується за температури від -4 до -160 °С протягом 4 – 48 годин з наступною обробкою сумішшю 12% розчину гідроксиду натрію та 96% етилового спирту (1:1). Замороженні зразки висушуються при температурі від -5 до +30 °С та атмосферному тиску від 0,01 до 1,0 атм. протягом 12 – 48 годин. До складу засобу можуть входити наступні речовини – трихлористе залізо, епсілон-амінокапронова кислота, транексамова кислота, вікасол, хлоргексидин, декаметоксин, аскорбінова кислота, піридоксин, бета-каротин, новокаїн, лідокаїн, тримекаїн, ультракаїн, йод, срібло, золото, мідь, цинк у кількості до 5% від маси засобу.

Використання заявляемого матеріалу та способу його виробництва з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє спростити процес виготовлення засобу місцевого призначення для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів на основі хітозану з використанням доступної сировини та відсутністю необхідності використання складного обладнання. Використання даного матеріалу дозволяє швидко сорбувати рідку частину крові, що призводить до концентрації формених елементів крові, зокрема еритроцитів та тромбоцитів, біля місця кровотечі. У подальшому відбувається адгезія еритроцитів та тромбоцитів на поверхні губки та швидке формування тромбу на місці травми, що призводить до зупинки кровотечі. Використання нетоксичного матеріалу в процесі виробництва засобу призводить до відсутності впливу на оточуючі тканини та розвитку системних ускладнень. Таким чином, заявляемий місцевий гемостатичний матеріал та спосіб його виготовлення дозволяє вирішити поставлене завдання.

Спосіб пропонується здійснювати наступним чином. В умовах операційної при виявленні кровотечі з паренхіматозного органу в наслідок розриву, ножового чи вогнепального поранення тощо, губка на основі хітозану, товщиною від 0,5 до 3 см розміщується поверх травмованої, кровоточивої ділянки, відбувається тиск на її

зовнішню сторону за допомогою долоні чи інструменту впродовж 5 хвилин. За необхідності час натискання може бути подовжено до 10 хвилин. Після візуального підтвердження зупинки кровотечі губку можна залишити в рані.

4 Результати дослідження

Скануюча електронна мікроскопія:

Десять шарів стандартної бавовняної марлі мають щільну мережу волокон з порами від 0,1 до 1,0 мм, що дозволяє всмоктуватися плазмі крові а також клітинам. Після просочення бавовни в хітозановому розчині і сушки ми бачимо, що бавовняне волокно покрито тонким шаром хітозану і пори не закриті (рис. 1). Це дозволяє крові контактувати з хітозаном і поглинатися всередину матеріалу.

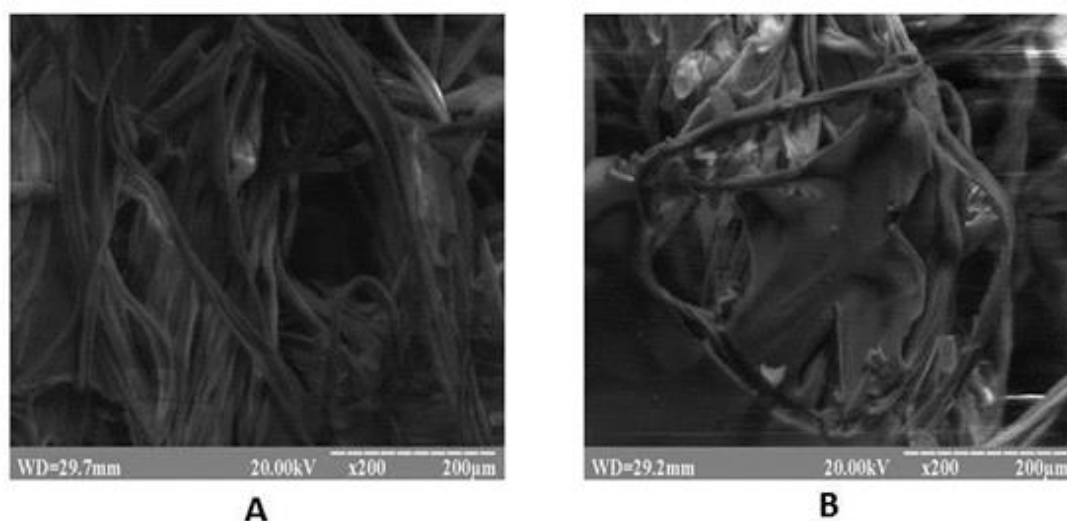


Рисунок 1 – Скануюча електронна мікроскопія марлевої пов'язки до (А) та після (В) обробки розчином хітозану.











Аглотинація еритроцитів

Абсолютний індекс гемаглютинації (++++) присутній в розчині 3% і 5% 500 кДа і 5% 200 кДа хітозана (рис. 2). Слабкий індекс гемаглютинації (++) в 3% 200 кДа розчині хітозану. Низький відсоток розчину хітозана (1% і 2% всіх MW) не викликає аглютинацію. У 2% 700 кДа розчині хітозану спостерігались невизначені результати через високу в'язкість розчину.

Сорбція крові

Стандартна марлева пов'язка (SGD), 2% G-Ch з молекулярною вагою 200 кДа, 500 кДа і 1% G-Ch з молекулярною вагою 700 кДа мають однакові сорбційні

властивості, всмоктуючи від 735 до 913,3 г (рис. 3). 3% і 5% G-Ch з MW 500 кДа поглинають значно менше крові в порівнянні з SGD і 2% 500 кДа G-Ch. Також 3% G-Ch з MW 500 кДа поглинається значно більше крові порівняно з 5% . Сорбції крові 3% і 5% G-Ch з MW 200 кДа значно менше порівняно з SGD і 2% 200 кДа G-Ch. Ми можемо бачити, що немає істотної відмінності між 3% і 5% 200 кДа G-Ch матеріалами. Крім того, ми не бачимо різниці між пов'язками з таким же відсотком просочення, але з різною молекулярною вагою.

Samples	*K+	**K-	700 kDa, 2%	700 kDa, 1%	500 kDa, 5%	500 kDa, 3%	500 kDa, 2%	200 kDa, 5%	200 kDa, 3%	200 kDa, 2%
Results	++++	-	N/A	-	++++	++++	-	++++	++	-
Image										

*positive control – erythrocyte mass and agglutinating serum

**negative control - erythrocyte mass and saline solution

Рисунок 2 – Результати тесту зразків на гемаглютинацію.

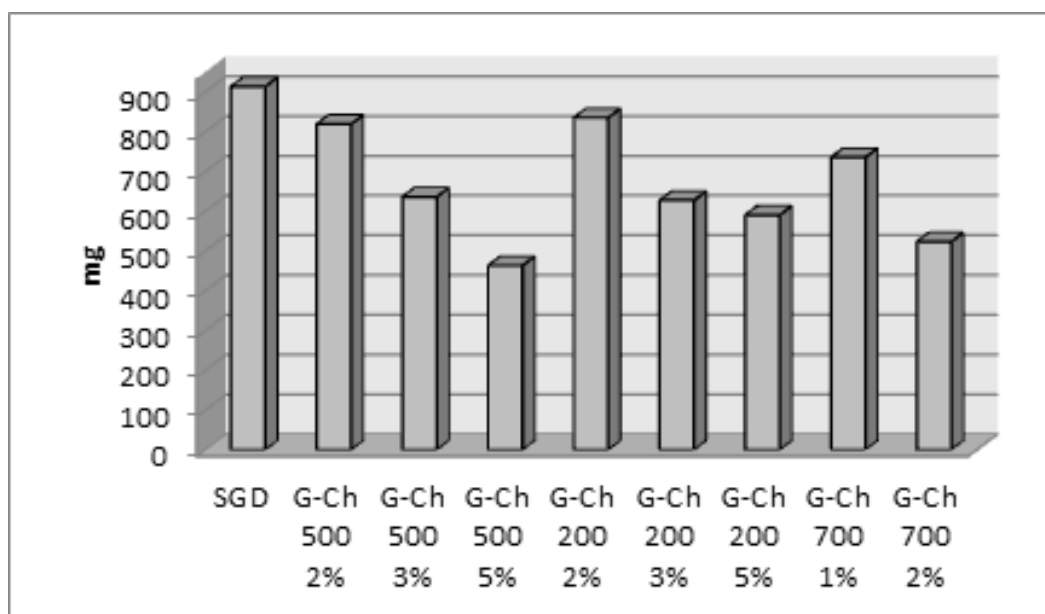


Рисунок 3. Сорбційна здатність стандартної марлевої пов'язки та матеріалів на основі хітозану

Загальний аналіз крові (CBC-тест)

Тест на згортання крові не показав ніяких змін коагулограми і різниці між SGD і матеріалами на основі хітозану. При проведенні CBC-тесту ми зосередилися на показниках еритроцитів і тромбоцитів. Поточний експеримент не показав істотних відмінностей між контролем (без лікування) і кров'ю, що взаємодіяла з хітозаном в концентрації еритроцитів, в рівні гемоглобіну, відсотковому вмісті еритроцитів і середньому об'ємі еритроцитів (рис. 4).

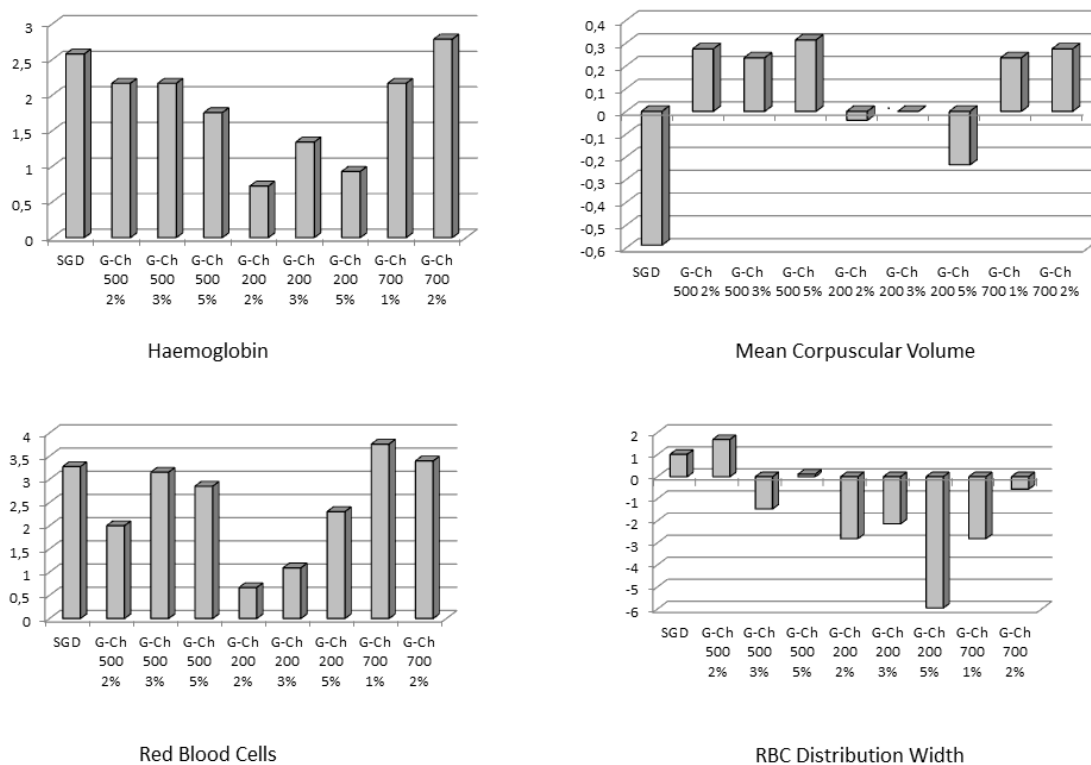


Рисунок 4 – Показники еритроцитів після взаємодії крові з матеріалами на основі хітозану

У порівнянні з еритроцитами, кількість тромбоцитів і його показники істотно змінювалися залежно від молекулярної ваги, відсотка хітозану в розчині і типу матеріалу (рис. 5). Всі типи G-Ch пов'язок, виготовлені з MW 200 кДа значно скорочують кількість тромбоцитів в крові протягом 10 хв після інкубації.

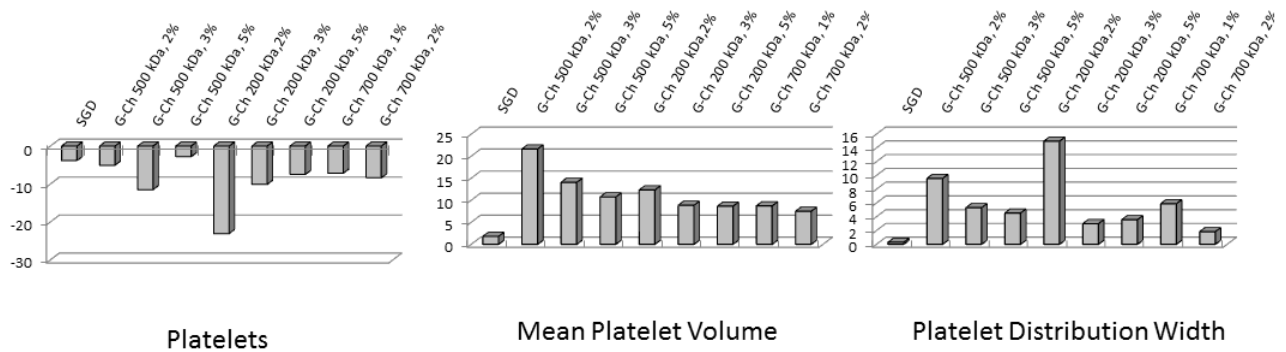


Рисунок 5 – Показники тромбоцитів після взаємодії крові з матеріалами на основі хітозану

Матеріали, виготовлені з 2% хітозанового розчину мають сильний ефект: рівень тромбоцитів знизився в порівнянні з контрольною групою на 23.03% ($p \leq 0,001$). Зразки з MW 700 кДа значно знизили рівень тромбоцитів, але різниця не перевищувала 8,33% ($p = 0,023$). Матеріали, виготовлені з хітозану 500 кДа не змінювали рівень тромбоцитів, за винятком зразків з 3%-им розчином, що викликало значне зниження концентрації клітин в крові.

Наші дані показують, що всі види G-Ch впливають на середній об'єм тромбоцитів. Матеріали, виготовлені з хітозану з MW 500 кДа викликають значне збільшення обсягу тромбоцитів в порівнянні з зразками 200 і 700 кДа. Найбільш помітну відмінність ми можемо бачити в матеріалах, виготовлених з 2% -го розчину хітозану MW 500 кДа – вона дорівнює 21,63% ($p \leq 0,001$). Середня ширина тромбоцитів змінюється тільки в зразках крові, що взаємодіяли з 2% хітозаном з MW 200 і 700 кДа. Всі інші зразки не впливають на цей показник.

Експеримент in- vivo

Для цього експерименту ми використовували G-Ch з MW 200 кДа і концентрацією 2% через його ефективність in-vitro. Ми бачимо, ефективність G-Ch марлі в 9 з 10 тварин порівняно з SGD, що зупиняє кровотечу в 20% випадків. Час гемостазу та об'єм крововтрати були визначені тільки в тварин, що вижили (рис. 6). Час гемостазу після застосування G-Ch ($256 \pm 24,71$ с) був в два рази менше,

порівняно з SGD ($510 \pm 11,34$ с.) . У тварин, яких піддавали лікуванню за допомогою G-CH втрата крові склала $105 \pm 17,32$ мг, але застосування SGD призвела до масивної крововтрати – $1046 \pm 164,43$ мг протягом кровоспинної процедури.

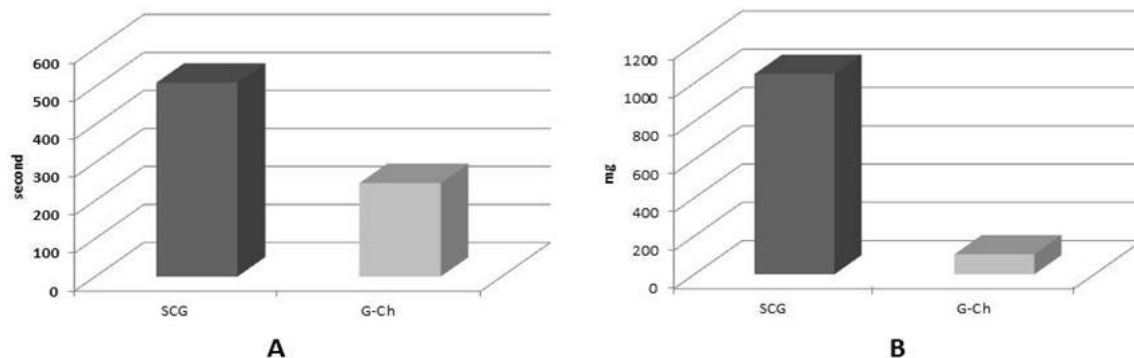


Рисунок 6 – Тривалість кровотечі (А) та об'єм крововтрати при використанні стандартної марлевої пов'язки та хітозан-вмісного засобу.

Скануюча електронна мікроскопія показала, що клітини крові не прикріплюються до SGD. Ми бачимо (рис. 7), що еритроцити трохи розповсюджуються на поверхні пов'язки, мають звичайну форму і не утворюють агрегатів. Порівнюючи ці результати, на G-Ch прикріпилося багато еритроцитів. Еритроцити занурилися в пухку речовину, яка ймовірно є саме хітозаном на поверхні марлі. Ми бачимо, що майже всі клітини змінюють свою форму і виглядають як сфероцити.

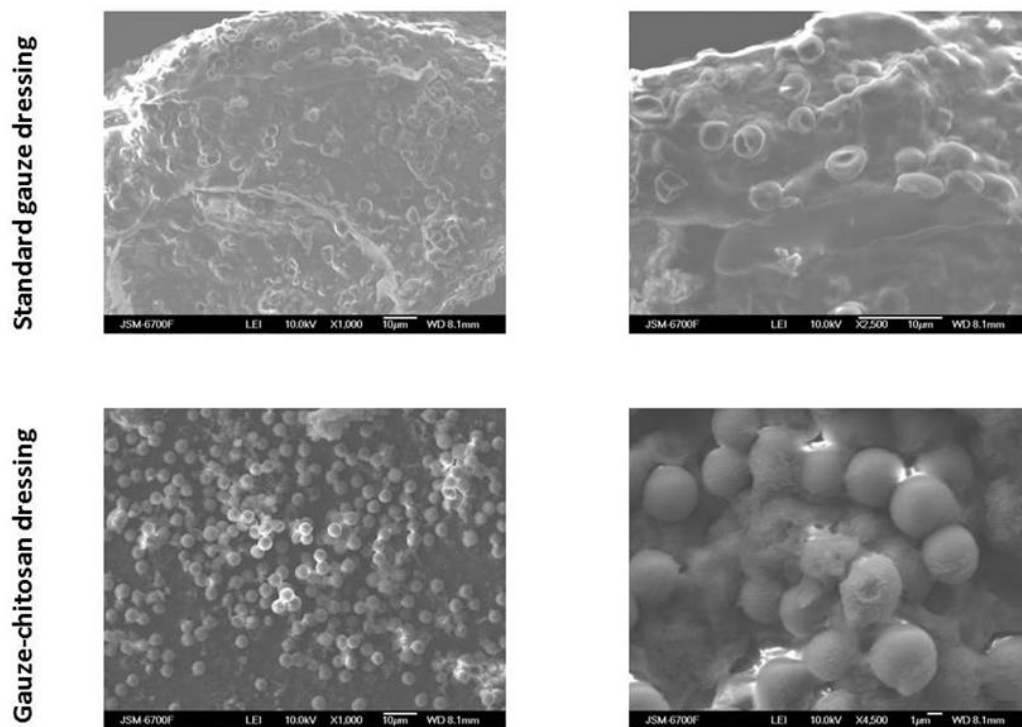


Рисунок 7 – Скануюча електронна мікроскопія стандартної марлевої пов'язки та засобу на основі хітозану після зупинки кровотечі.

5 Обговорення результатів дослідження.

Хітозан може мати різну молекулярну масу, ступінь деацетилювання, і може бути хімічно змінений. Це катіонний полімер і може зв'язувати еритроцити через їх аніону природу [23]. Гемаглютинація в поточному експерименті показує, що аглютинація еритроцитів сильно залежить від концентрації хітозану в розчині і не в значній мірі залежить від його молекулярної маси. Всі зразки з концентрацією хітозану від 3% до 5% показують аглютинацію, проти 1% і 2% розчинів. Агрегація еритроцитів в розчині хітозану, а також плівок і наночастинок хітозану представлена в деяких дослідженнях, але вони не показують відносини між концентрацією хітозану і ефекту аглютинації. Крім того, S.V. Rao показав, що 2% плівки на основі наночастинок хітозана викликають гемаглютинацію [41]. У нашому дослідженні ми спостерігали слабку аглютинацію тільки в 2% -ому 200 кДа розчині хітозану, хітозан з іншою молекулярною вагою з тією ж концентрацією не викликає агрегації еритроцитів. Можливо, розчини хітозану з високою концентрацією мають більш протоновані групи і таким чином більше шансів зв'язуватись з еритроцитами. Але дуже висока концентрація збільшує в'язкість розчину хітозану і зменшує ефект аглютинації. Наші експерименти показують, що висока молекулярна вага підвищує в'язкість і не складно робить розчин високої концентрації з низькомолекулярного хітозану з тим же ефектом аглютинації.

Сорбційні властивості важливі для кровоспинного засобу за рахунок можливості швидкої сорбції плазми і збільшенням концентрації клітин крові, особливо еритроцитів і тромбоцитів біля пошкодженої судини. Наші дані довели, що матеріали з бавовни і хітозана з середньої та високої молекулярної ваги всмоктують таку ж кількість крові як стандартна бавовняна марля. Низька молекулярна вага хітозану значно знижує сорбційні властивості бавовняної пов'язки.

СВС- тест не показує різницю в кількості еритроцитів, а також їх об'єм і ширину. Деякі дослідники показали, що матеріали на основі хітозану можуть змінювати форму еритроцитів, але вони не доводили адгезію еритроцитів на

хітозані. Klokkevold та ін. показав, що еритроцити кроликів при взаємодії з хітозаном втратили типову двояковогнуту морфологію і, здавалося, мають незвичайну спорідненість один до одного [47]. Kind та ін. не бачили будь-яких змін еритроцитів після контакту з хітозановим матеріалом [14]. Наш експеримент показав, що вплив на еритроцити залежить від форми хітозану: розчин з високою концентрацією викликають коагуляцію еритроцитів, але матеріал на основі хітозану не впливає на звичайні людські еритроцити.

Тромбоцити є важливими медіаторами, які стимулюють механічний шлях каскаду коагуляції. Попередні дослідження показали, що тромбоцити прикріплювалися до матеріалів на основі хітозану залежно від часу і концентрації [17]. Shen та ін. виявили, що хітозан впливає на адгезію і агрегацію тромбоцитів, зазначивши, що рівень агрегації пов'язаний з концентрацією тромбоцитів у плазмі [42]. Наші дані показують, що рівень тромбоцитів значно знизився в крові протягом 10 хв взаємодії з хітозаном, які довели їх адгезію на матеріалі на основі хітозану. Адгезія залежить від молекулярної маси і концентрації. Низька і висока MW хітозан-бавовняної марлі значно знижує рівень тромбоцитів, а середня MW так не впливає. Висока концентрація хітозану (3% і 5%) знижує адгезію тромбоцитів. Форма тромбоцитів (обсяг і ширина) змінилася у всіх хітозан-бавовняних групах, але найбільш значущі зміни спостерігалися в зразках з молекулярною вагою 500 кДа. Можливо, хітозан з меншою і більшою молекулярною вагою адсорбували більше тромбоцитів і, ймовірно, змінили їх форму, та ми не бачимо їх в залишку крові. Середня молекулярна вага хітозану не адсорбує багато клітин, але значно змінює їх форму. Спостерігалися такі ж морфологічні показники тромбоцитів під час утворення згустку, який довів гемостатичний потенціал матеріалів на основі хітозану. Механізми, які викликають адгезію тромбоцитів і активацію хітозаном досі повністю не зрозумілі. Є деякі свідчення того, що хітозан може активувати глікопротеїн ІІb / ІІІa та стимулювати вивільнення тромбоксану A₂ / ADP і ці сигнали збільшують поширення тромбоцитів та зміцнюють стабільність адгезії [50].

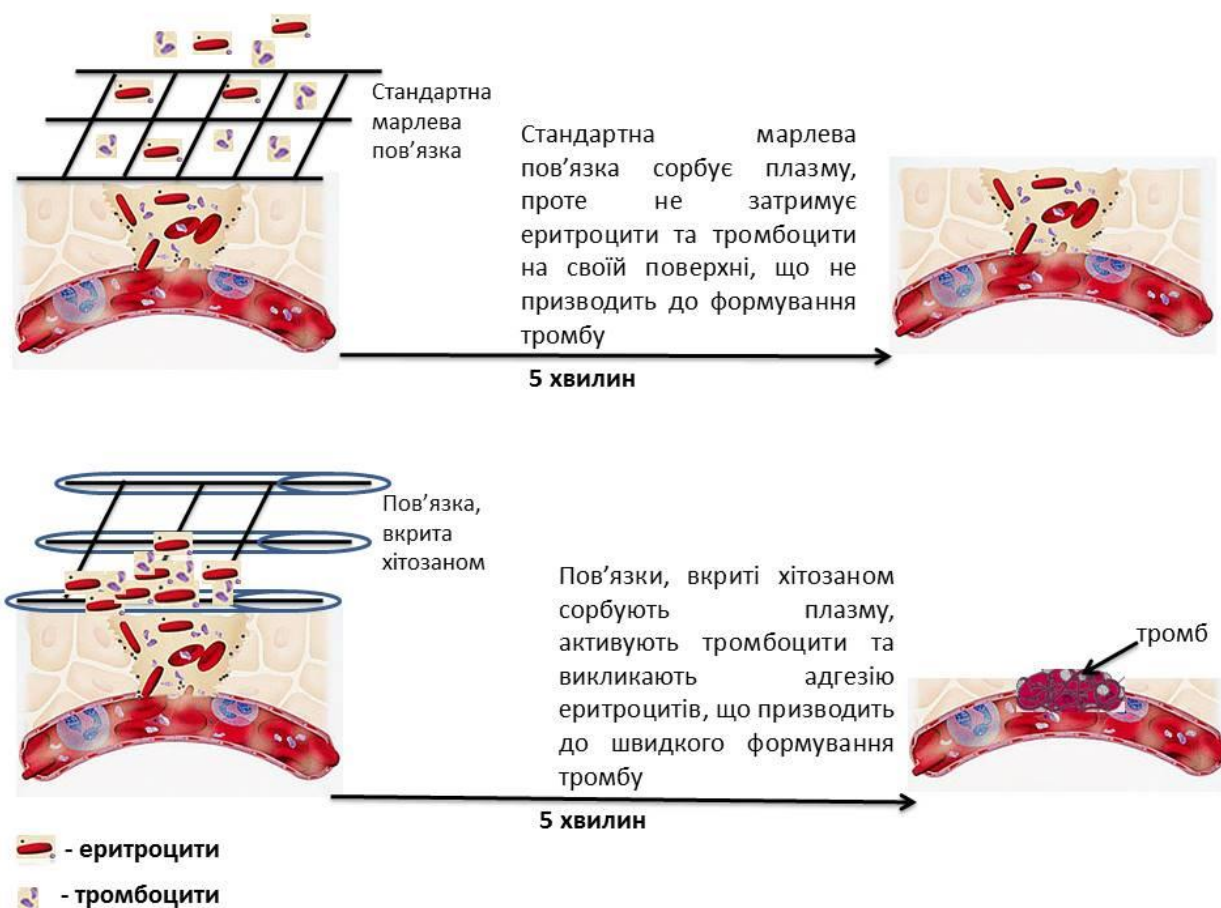


Рисунок 8 – Запропонований механізм гемостазу при застосуванні хітозанової пов'язки у порівнянні зі стандартною марлевою пов'язкою.

In-vivo результати показали 90% ефективність матеріалів на основі хітозану порівняно з 20% у контрольній групі з SGD. У ряді досліджень, матеріали на основі хітозану забезпечують до 100% ефективність при різних моделях травми [19]. Дуже важливим є час гемостазу і обсяг крововтрати під час лікування. Наші дані показали, що застосування матеріалів на основі хітозану зменшили ці параметри в 2 і 10 разів порівняно з SGD. Koksal O. і співавтори показали, що Celox зупиняє кровотечу у щурів, використовуючи антикоагулянти після 90 с. порівняно зі стандартним ручним натиском, що було неефективним [24]. Інший матеріал HemCon зупиняв кровотечу в моделі травми поверхневої стегнової артерії після $6,94 \pm 3,9$ хв.

Підводячи підсумок наших результатів і літературних даних про дію хітозану на згортання крові і гемостазу ми пропонуємо механізм дії нашої пов'язки приготуваної просочуванням бавовняної марлі в хітозановому розчині. Після

застосування стандартної бавовняної марлі сорбується плазма і клітини крові, але останні не прикріплюються до пов'язки. У цьому випадку, марля діє як провідник для крові та не утворюють згустку на пошкодженій артерії. Хітозан прикріплює еритроцити та тромбоцити на поверхню марлі, що повертає до пошкоджень. Також хітозан може поглинати фібрин, що утворює мережу над пошкодженою артерією. Це полегшить формування згустку і запобігає подальшій кровотечі (рис. 8).

Висновки

1. Нанесення гелю хітозану на марлеву основу призводить до формування тонкого шару хітозану на поверхні волокон, що не веде до суттєвого зменшення пористості та гігроскопічності матеріалу. Будова модифікованого матеріалу не має особливостей від молекулярної маси хітозану та його відсотку у гелі. При цьому, зростання частки хітозану в розчині призводить до зменшення сорбційної здатності матеріалу.
2. Аглотинація еритроцитів відбувається в 3% та 5% розчинах хітозану, в той час як зі зменшенням концентрації відбувається погіршення аглютинаційних властивостей.
3. Кількість еритроцитів, їх морфологічні особливості та вміст гемоглобіну не змінюються при взаємодії з матеріалами на основі хітозану. Натомість відбувається зменшення кількості тромбоцитів з максимумом 23,03% для 2% розчину хітозану з молекулярною масою 200 кДа. Одночасно зростає об'єм та ширина білих кров'яних тілець до 21,2% та 11,5% для 2% 500 кДа хітозану та до 12,5% та 14,7% - при взаємодії з матеріалом з 2% вмістом 200 кДа хітозану.
4. Експеримент на моделі травми стегнової артерії показав 90% ефективність пов'язки з 2% хітозаном з молекулярною масою 200 кДа проти 20% при використанні стандартної марлевої пов'язки. Удвічі відбувається зменшення часу кровотечі та у 10 разів – кількість втраченої крові. Растрова електронна мікроскопія показала значну адгезію еритроцитів на поверхності матеріалу та їх агрегацію.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. A new, pluronic-based, bone hemostatic agent that does not impair osteogenesis / MY Wang, JK Armstrong, TC Fisher, et al // *Neurosurgery*. – 2001. – V. 49. – P. 962–967.
2. A phase 3, randomized, double blind comparative study of the efficacy and safety of topical recombinant human thrombin and bovine thrombin in surgical hemostasis / WC Chapman, N Singla, Y Genyk, et al // *J Am CollSurg*. – 2007. – V. 205. – P. 256–265.
3. A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic Dressing: Experience in Current Combat Operations / Wedmore Ian, G McManus John, E. Pusateri Anthony et al // *Trauma*. – 2006. – V. 60. – P. 655– 658.
4. Advanced hemostatic dressing development program: animal model selection criteria and results of a study of nine hemostatic dressings in a model of severe large venous hemorrhage and hepatic injury in swine / AE Pusateri, HE Modrow, RA Harris, et al // *J Trauma*. – 2003. – V. 55. – P. 518 –526.
5. An unusual jugal abscess after third molar extraction: a complication of hemostatic wax / L Brignol, L Guyot, O Richard et al. // *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. – 2007. – V. 108. – P. 150 –152.
6. Analgesic effects of chitin and chitosan / Y Okamoto, K Kawakami, K Miyatake, et al // *Carbohydr Polym*. – 2002. – V. 49. – P. 249–252.
7. Antihuman factor V antibodies after use of relatively pure bovine thrombin / JH Lawson, KA Lynn, RM Vanmatre, et al // *Ann Thorac Surg*. – 2005. – V. 79. – P. 1037–1038.
8. Arand AG. Intraoperative chemical hemostasis in neurosurgery / AG Arand, R Sawaya // *Neurosurg*. – 1986. – V.18: – P. 223.
9. BioGlue and Dermabond save time, leak less, and are not mechanically inferior to two-layer and modified one-layer vasovasostomy / MM Saunders, ZC Baxter, A Abou-Elella, et al // *Fertil Steril*. – 2009. – V. 91. – P. 560 –565.

10. BioGlue Surgical Adhesive—an appraisal of its indications in cardiac surgery / J Passage, H Jalali, RK Tam, et al. // *Ann Thorac Surg.* – 2002. – V. 74. – P. 432–437.
11. Brian T.G. Effects of Celox and TraumaDEX on Hemorrhage Control in a Porcine Model / T.G. Brian // *AANA Journal.* – 2010. – V. 78(2). – P. 115-120.
12. Buddy G. Kozen. An Alternative Hemostatic Dressing: Comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot / G. Kozen Buddy // *Academic Emergency Medicine.* – 2008. – [V. 15\(1\).](#) – P. 74–81.
13. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation / TC Chou, E Fu, CJ Wu et al // *Biochem and Biophy Res Com.* – 2003. – V. 302. – P. 480–483.
14. Chitosan: evaluation of a new hemostatic agent / GM Kind, SD Bines, ED Staren, et al // *Curr Surg.* – 1990. – V. 47. – P. 37–39.
15. Collagen/Chitosan Matrices for Artificial Livers / XH Wang, DP Li, WJ Wang, et al // *Biomaterials.* – 2003. – V. 24. – P. 3213– 3220.
16. Comparative in vitro analysis of topical hemostatic agents / WR Wagner, JM Pachence, J Ristich, et al // *J Surg Res.* – 1996. – V. 66. – P. 100–108.
17. Comprehensive Review of Topical Hemostatic Agents Efficacy and Recommendations for Use / E Achneck Hardean. , M Jamiolkowski Ryan, M. Albala David et al // *Ann Surg.* – 2010. – V. 251. – P. 217–228.
18. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties / S-Y Ong, J Wu, SM Mochhala, et al // *Biomaterials.* – 2008. – V. 29. – P. 4323–4332.
19. Effect of fibrin bandage fibrinogen concentration on blood loss after grade V liver injury in swine / AE Pusateri, JB Holcomb, RA Harris, et al // *Mil Med.* – 2001. – V. 166. – P. 217–222.
20. Efficacy of a fibrin hemostatic bandage in controlling hemorrhage from experimental arterial injuries / MJ Larson, JC Bowersox, RC Jr Lim, et al. // *Arch Surg.* – 1995. – V. 130. – P. 420–422.

21. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system / W Fan, W Yan, Z Xu et al // [Colloids Surf B Biointerfaces.](#) – 2012. – V. 95. – P. 258-265.
22. Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan Nanoparticles Using Human Erythrocytes / Muniz de Lima Jefferson, Rodrigues Sarmiento Ronaldo, Rodrigues de Souza Joelma, et al // *BioMed Research International.* – 2015, 6 pages. Article ID 247965. doi:10.1155/2015/247965
23. Hemostatic dressings for the first responder: a review / MC Neuffer, J McDivitt, D Rose, et al // *Mil Med.* – 2004. – V. 169. – P. 716 –720.
24. Hemostatic effect of a chitosan linear polymer (Celox®) in a severe femoral artery bleeding rat model under hypothermia or warfarin therapy / O.Koksal, O.Fatma, CE Betül, et al // *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery.* – 2011. – V. 17(3). – P. 199 – 204.
25. Ibrahim MF. A foreign body reaction to Surgicel mimicking an abscess following cardiac surgery / MF Ibrahim, C Aps, CP Young // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2002. – V. 22. – P. 489–490.
26. Improved intraoperative management of anastomotic bleeding during aortic reconstruction: results of a randomized controlled trial / RC Hagberg, HJ Safi, J Sabik, et al // *Am Surg.* – 2004. – V. 70. – P. 307–311.
27. Infection rates and healing using bone wax and a soluble polymer material / T Wellisz, YH An, X Wen, et al // *Clin Orthop Relat Res.* – 2008. – V. 466. – P. 481–486.
28. Johnson P. Effects of bone wax on bacterial clearance / P. Johnson, D Fromm // *Surgery.* – 1981. – V. 89. – P. 206 –209.
29. Kean T. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan / T. Kean, M. Thanou // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2010. – V. 62. – P. 3–11.
30. Madihally SV. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering / SV Madihally, HWT Matthew // *Biomaterials.* – 1999. – V. 20. – P. 1133–1142.

31. [Mark A. Brown](#). Worley Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System / A. Brown [Mark](#), R. Daya [Mohamud](#), A. Joseph // The Journal of Emergency Medicine. – 2009. – V. 37(1). – P. 1-7.
32. Mechanism regulated platelet spreading after initial platelet contact with collagen / CC Wu, FN Ko, TF Hung, et al // Biochem Biophys Res Com. – 1996. – V. 220. – P. 388–393.
33. Mercy HP. Chitosan-derivates as hemostatic agents: their roles in tissue regeneration / HP Mercy, AS Halim, AR Hussein // Regenerative Research. – 2012. – V. 1(1). – P. 38-46.
34. Palm MD. Topical hemostatic agents: a review / MD Palm, JS Altman // Dermatol Surg. – 2008. – V. 34. – P. 431– 445.
35. Park BK. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine / BK Park, MM Kim // International Journal of Molecular Sciences. – 2010. – V. 11. – P. 5152–5164.
36. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions / R. Bettini, A.A. Romani, M.M. Morganti et al // Eur J Pharm Biopharm. – 2008. – V. 68. – P. 74-81.
37. Preparation and characterization of chitosan–heparin composite matrices for blood contacting tissue engineering / H Qing, A Qiang, KaiGong, et al // Biomed Mater. – 2010. – V. 5.
38. Prevalence of gastric varices and results of sclerotherapy with N-butyl 2 cyanoacrylate for controlling acute gastric variceal bleeding / K Mumtaz, S Majid, H Shah, et al // World J Gastroenterol. – 2007. – V. 13. – P. 1247–1251.
39. Pruthi RS. The use of a fibrin tissue sealant during laparoscopic partial nephrectomy / RS Pruthi, J Chun, M Richman // BJU Int. – 2004. – V. 93. – P. 813–817.
40. Randomized clinical trial offibrin sealant in patients undergoing resternotomy or reoperation aftercardiac operations. A multicenter study / J Rousou, S Levitsky, L Gonzalez-Lavin, et al // J ThoracCardiovasc Surg. – 1989. – V. 97. – P. 194–203.

41. Rao SB. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential / SB Rao, CP Sharma // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1997. – V. 34. – P. 21–28.
42. Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible bio-material for platelet-rich plasma preparation / EC Shen, TC Chou, CH Gau, et al // *Clin Oral Impl Res.* – 2006. – V. 17. – P. 572–578.
43. Reoperation for bleeding in trauma / A Hirshberg, MJ Wall, MK Ramchandani et al // *Arch Surg.* – 1993. – V. 128. – P. 1163–1167.
44. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications / M.Rinaudo // *Prog Polym Sci.* – 2006. – V. 31. – P. 603–632.
45. Structural design of the dry fibrin sealant dressing and its impact on the hemostatic efficacy of the product / AE Pusateri, BS Kheirabadi, AV Delgado, et al // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2004. – V. 70. – P. 114–121.
46. Sudmann B. Histologically verified bone wax (beeswax) granuloma after median sternotomy in 17 of 18 autopsy cases / B Sudmann, G Bang, E Sudmann // *Pathology.* – 2006. – V. 38. – P. 138–141.
47. The effect of chitosan on lingual hemostasis in heparinized rabbits / PR Klokkevold, H Fukayama, EC Sung et al // *J Oral Maxillofac Surg.* – 1999. – V. 57. – P. 49–52.
48. The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins / SL Megan, C Bill, J McCarthy Simon., et al // *Biomaterials.* – 2011. – V. 32. – P. 6655–6662.
49. The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose / C Schonauer, E Tessitore, G Barbagallo, et al // *Eur Spine J.* – 2004. – V. 13(1). – P. 89–96.
50. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine / C Shi, Y Zhu, X Ran, et al // *Journal of Surgical Research.* – 2006. – V. 133. – P. 185–192.
51. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review / Y.Tomizawa // *J Artif Organs.* – 2005. – V. 8. – P. 137–142.

52. Toriumi DM. Cyanoacrylate tissue adhesives for skin closure in the outpatient setting / DM Toriumi, AA Bagal // *Otolaryngol Clin North Am.* – 2002. – V. 35. – P. 103–118.
53. Treatment of splenic injury during laparoscopic nephrectomy with BioGlue, a surgical adhesive / G Biggs, J Hafron , J Feliciano, et al. // *Urology.* – 2005. – V. 66. – P. 882.