УДК: 61.616.617.3

ПРИМЕНЕНИЕ МЕСТНОГО ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КРОВОПОТЕРИ ВО ВРЕМЯ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ КРУПНЫХ СУСТАВОВ

Асилова С.У.[1,2], Тухтапулатов А.Т.[3], Милушева Р.Ю.[4], Рахманова В.Н.[4], Ахмедова Д.Б.[2]

KATTA BO'G'IM ARTROPLASTIKASI PAYTIDA QON YO'QOTISHNI MODELLASHTIRISHDA XITOZAN ASOSIDAGI MAHALLIY GEMOSTATIK VOSITADAN FOYDALANISH

Asilova S.U.[1,2], To'xtapulatov A.T.[3], Milusheva R.Yu.[4], Raxmanova V.N.[4], Axmedova D.B.[2]

USE OF A CHITOSAN-BASED LOCAL HEMOSTATIC AGENT IN MODELING BLOOD LOSS DURING LARGE JOINT ARTHROPLASTY

Asilova S.U.[1,2], Tukhtapulatov A.T.[3], Milusheva R.Yu.[4], Rakhmanova V.N.[4], Akhmedova D.B.[2]

[1]Ташкентский международный университет Киме, [2]Ташкентский государственный медицинский университет, [3]Ташкентская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, [4]Институт химии и физики полимеров АН РУз

Maqsad: *operatsiya vaqtida qon yo'qotishni modellashtirishda, qon yo'qotish hajmini, gemostaz vaqtini va qon yo'qotish indeksini baholashda xitozan asosidagi mahalliy gemostatik vositaning samaradorligini baholash.* ***Material va usullar:*** *tadqiqot har biri oltita hayvondan iborat to'rt guruhga bo'lingan 24 ta katta quyonda o'tkazildi: butun (jarohatlanmagan yoki qon yo'qotilmagan), nazorat (davolashsiz qon yo'qotish modeli), taqqoslash guruhi (standart davolash) va xitozan bilan davolangan guruh. Qon yo'qotish oyoq-qo'llarga standartlashtirilgan jarrohlik aralashuvlar yordamida modellashtirildi. Tajriba davomida qon yo'qotish hajmining vaznga nisbati (ml/kg) sifatida hisoblangan hayvonning vazni, qon yo'qotish hajmi, qon ketish vaqti va qon yo'qotish indeksi qayd etildi.* ***Natijalar:*** *xitozanni topikal qo'llash simulyatsiya qilingan qon yo'qotish paytida gemostaz parametrlarini sezilarli darajada yaxshilaydi, bu esa uni operatsiya vaqtidagi qon ketishining oldini olish va davolashda klinik qo'llanilish uchun istiqbolli dori vositasiga aylantiradi. Biomosligi va mavjudligini hisobga olgan holda, xitozan jarrohlar va travmatologlar arsenalida qimmatli vositaga aylanishi mumkin, bu qon yo'qotishdan aziyat chekadigan bemorlarning o'limini kamaytirish va hayot sifatini yaxshilashga yordam beradi.* ***Xulosalar:*** *kelajakdagi tadqiqotlar turli jarrohlik muolajalarida qulayroq va samaraliroq foydalanish uchun xitozanning yangi shakllarini, masalan, kukunlar, gubkalar yoki plyonkalarni ishlab chiqishga qaratilishi mumkin.*

Kalit so'zlar: *katta bo'g'imlarni almashtirish, qon yo'qotish modeli, gemostatik vositalar, xitozan.*

Objective: *To evaluate the effectiveness of a chitosan-based local hemostatic agent in modeling intraoperative blood loss, assessing blood loss volume, hemostasis time, and blood loss index.* ***Material and methods:*** *The study was conducted on 24 adult rabbits divided into four groups of six animals each: intact (no injury or blood loss), control (blood loss model without treatment), comparison group (standard treatment), and a chitosan-treated group. Blood loss was modeled using standardized surgical interventions on the extremities. Animal weight, blood loss volume, bleeding time, and blood loss index, calculated as the ratio of blood loss volume to weight (ml/kg), were recorded during the experiment.* ***Results:*** *Topical application of chitosan significantly improves hemostasis parameters during simulated blood loss, making it a promising drug for clinical use in the prevention and treatment of intraoperative bleeding. Given its biocompatibility and availability, chitosan could become a valuable tool in the arsenal of surgeons and traumatologists, helping to reduce mortality and improve the quality of life of patients suffering from blood loss.* ***Conclusions:*** *Future research could focus on developing new forms of chitosan, such as powders, sponges, or films, for more convenient and effective use in various surgical procedures.*

Key words: *large joint replacement, blood loss model, hemostatic agents, chitosan.*

Кровопотеря при травматологических и ортопедических оперативных вмешательствах остается одной из ключевых и наиболее актуальных проблем современной клинической медицины [3]. Масштаб и сложность данных операций, обусловленные зачастую выраженными повреждениями мягких тканей, внутрисуставными кровоизлияниями и нарушением целостности крупных сосудистых структур, способствуют значительной кровопотере. Объем кровопотери варьирует от минимальных значений до критических уровней, требующих экстренной трансфузии компонентов крови и в ряде случаев – повторного хирургического вмешательства для гемостаза [1,4].

Неконтролируемая кровопотеря сопровождается развитием тяжелых осложнений, таких как гиповолемический шок, нарушение микроциркуляции, снижение тканевой перфузии и кислородного обеспечения жизненно важных органов, тромбоэмболические события, а также замедленное заживление послеоперационных ран. Эти патогенетические механизмы негативно влияют на клинический исход, увеличивают продолжительность госпитализации и повышают риск формирования хронических патологических состояний [5,6,8].

В связи с вышеизложенным контроль кровотечения и снижение объема кровопотери остаются приоритетными задачами в травматологии и ортопедии. Современные хирургические подходы ориентированы на минимизацию кровопотери посредством комплексной предоперационной подготовки пациента (коррекция сопутствующих патологий, оптимизация системы гемостаза), применения щадящих оперативных методик, а также использования электрокоагуляции, ультразвукового гемостаза и других современных технологий. Тем не менее, несмотря на прогресс в области хирургии, необхо-

димость в дополнительных гемостатических средствах сохраняется.

В последние годы в арсенале травматологов и ортопедов все более широкое применение находят местные гемостатические препараты [2], в частности препараты на основе хитозана. Хитозан представляет собой линейный полисахарид, получаемый посредством деацетилирования хитина – природного компонента экзоскелетов ракообразных (например, креветок и крабов), грибов и диатомовых водорослей. Его уникальные физико-химические свойства обусловлены положительным зарядом молекул, обеспечивающим специфическое взаимодействие с отрицательно заряженными компонентами крови (фосфатами, нуклеиновыми кислотами).

При контакте с кровью хитозан индуцирует агрегацию тромбоцитов, активирует каскад свертывания и способствует формированию плотного гелевого сгустка, механически герметизирующего кровоточащий участок. Дополнительно он характеризуется высокой биосовместимостью, отсутствием иммуногенной активности, а также способностью стимулировать регенеративные процессы в тканях. В клинической практике применяются различные формы хитозана – порошки, губки, пленки, гели, что обеспечивает широкий спектр вариантов применения в зависимости от локализации и характера кровотечения. Так, порошкообразные формы обеспечивают легкость нанесения на кровоточащую поверхность, а губчатые структуры создают объемный каркас для эффективного гемостаза в полостных ранах [7].

Благодаря высокой гемостатической эффективности, биосовместимости и удобству применения препараты на основе хитозана становятся все более востребованными в травматологии и ортопедии, способствуя снижению риска послеоперационных осложнений и улучшению клинических исходов пациентов.

Цель исследования

Оценка эффективности местного гемостатического препарата на основе хитозана в моделировании интраоперационной кровопотери с оценкой объема кровопотери, времени гемостаза и индекса кровопотери.

Материал и методы

Исследование проведено на 24 взрослых кроликах, разделённых на четыре группы по 6 животных в каждой: интактная (без травмы и кровопотери), контрольная (модель кровопотери без лечения), группа сравнения (стандартное лечение) и группа с применением хитозана.

Животные содержались в карантине в течение двух недель перед началом эксперимента, в стандартных условиях при температуре 20-22ºC и относительной влажности 50-60%. Рацион состоял из сбалансированного корма, соответствующего физиологическим потребностям животных.

Масса животных всех групп была сопоставимой и не имела статистически значимых различий (среднее значение варьировало от 2,1 до 2,3 кг), что свидетельствует о гомогенности групп и исключает влияние массы на изучаемые показатели.

Моделирование кровопотери осуществлялось путем стандартизированного хирургического вмешательства на конечностях. В ходе эксперимента фиксировались масса животного, объем кровопотери, время остановки кровотечения и индекс кровопотери, рассчитанный как отношение объема кровопотери к массе (мл/кг).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью критерия Стьюдента (t-тест) для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при уровне $p<0,05$.

Все процедуры выполнялись в соответствии с этическими нормами экспериментов на животных.

Результаты и обсуждение

Хитозан. Элементарное звено ХЗ $[C_6H_{11}NO_4]$ n характеризуется наличием аминогруппы (NH_2), алифатической метиленовой (CH) группой и гидроксильными (OH) группами при C-3 и C-6 [1,3]. Молекулярная масса элементарного звена составляет $M_o \approx 61$ г/моль.

Сульфатирование проводили согласно [4] при различном соотношении хитозана и сульфатирующего агента и повышенной температуре. Исходный хитозан, синтезированный из хитина Bombyx mori, характеризуется степенью деацетилирования ≈ 92% и молекулярной массой 58 kDa. Соблюдение этих условий реакции приводит к сульфатированию NH2-групп (в положении C-2) и OH-групп (в положениях C-3 и C-6) элементарного звена хитозана по реакции (рис. 1):

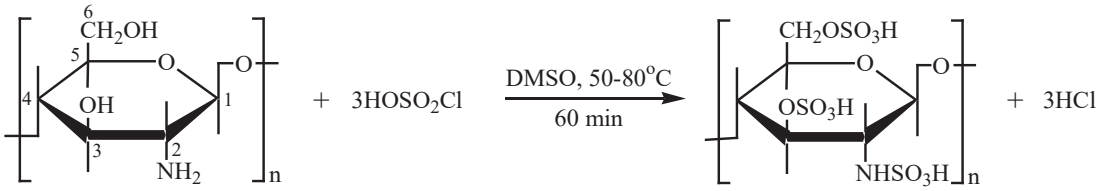


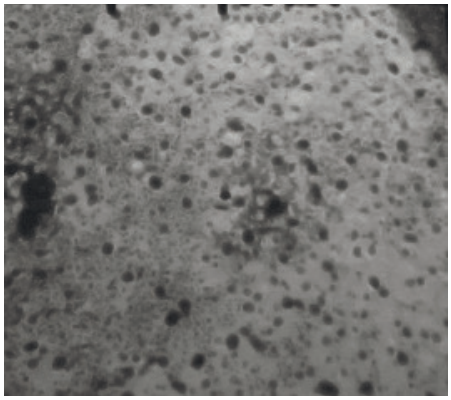
Рис. 1. Схема реакции сульфатирования хитозана.

Последовательность функциональных групп в положениях C-2, C-3, C-6 элементарного звена хитозана по нуклеофильности и реакционной способности уменьшается в следующем порядке: $-NH_2 > -CH_2-OH > -CH-OH$ (стерически затрудненная группа). При этом такие нуклеофилы оказывают сильное воздействие на положительно заряженные атомы серы, что приводит к замещению атома хлора в субстрате на вышеуказанные группы.

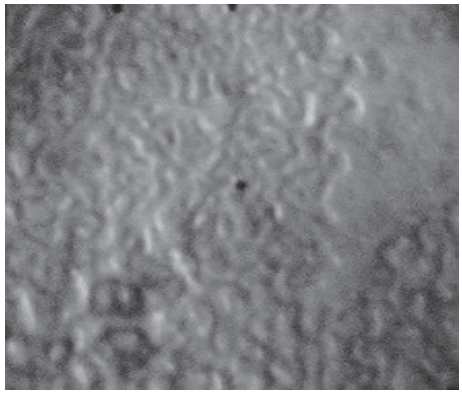
На ИК-спектре образца сульфат хитозана имеются характерные полосы поглощения, обусловленные наличием сульфоновой (R–SO_3H)-группы при 1200-1090 $см^{-1}$ и полоса поглощения с основным максимумом в области 1240 $см^{-1}$, которая связана с асимметричными валентными колебаниями сульфатных групп S=O. В области при 790 $см^{-1}$ появляется четкий максимум, характеризующий валентные колебания сульфатных групп (C–O–S связей).

Для проведения медико-биологических испытаний получены образцы сульфата хитозана Bombyx mori с концентрациями 0,025 и 0,05% и на их основе получены наносистемы сульфата хитозана. Исследовано наноструктурирование, т.е. образование наночастиц (НЧ) и агрегирование наночастиц сульфата хитозана в водном растворе путем осаждения в ацетоне и этиловом спирте [5]. Образование наноструктур стимулировано ультразвуковой обработкой после добавления определенного количества осадителя. Структуры наносистем сульфата хитозана Bombyx mori исследованы методами атомно-силового микроскопа (АСМ) и динамического рассеяния света (dynamic light scattering DLS), которые позволяет оценить размеры и распределение наночастиц.

Показано, что образцы наносистем сульфата хитозана характеризуются наличием в них НЧ сферической и эллипсоидной форм (рис. 2а, б).



а) 0,1% раствор сульфата хитозана, осажденный в этиловом спирте. Наночастицы: 20 ё



б) 0,3% раствор сульфат хитозана, осажденный в этиловом спирте. Агрегаты НЧ: 200 ё

Рис. 2. Снимок НЧ сульфата хитозана, при осаждении в спирте, исследованные методом АСМ.

Результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ) подтверждают, что в полученных образцах наносульфат хитозана имеются наночастицы размерами от 20 до 70 нм с равномерным распределением по поверхности.

Также выявлено, что при ультразвуковой диспергации размеры НЧ СХЗ уменьшаются, и распределение становится унимодальным.

Полученные результаты показывают, что при увеличении степени замещения и содержания серы в сульфате хитозана происходит увеличение содержания наночастиц. Можно предположить, что СХЗ в водном растворе находится не в виде изолированных макромолекул, а в виде ассоциатов, состоящих из нескольких макромолекул, имеющих размеры наночастиц.

Медицина

При моделировании интраоперационной кровопотери на лабораторных животных были получены данные об объеме кровопотери, времени остановки кровотечения и индексе кровопотери (рис. 3). В данном разделе представлены результаты исследования и их анализ, направленные на оценку эффективности местного гемостатического средства на основе хитозана.

У животных интактной группы, являющейся контролем без искусственно вызванного кровотечения, средний объем кровопотери, естественно, отсутствовал (0 мл), что является отражением нормального физиологического состояния и отсутствия каких-либо патологических изменений в системе гемостаза. В контрольной группе, созданной для моделирования кровопотери без какого-либо вмешательства, средний объем кровопотери составил 8,27 мл. Этот показатель служит базовым уровнем для оценки эффективности различных методов гемостаза. У животных, получавших препарат сравнения, представляющий собой стандартное лечение для остановки кровотечения (раствор транексамовой кислоты или другой общепринятый гемостатический препарат), объем кровопотери был на 17,4% меньше, чем в контрольной группе. Такая динамика свидетельствует об эффективности примененного метода и его способности снижать кровопотерю по сравнению с отсутствием лечения.

Наиболее выраженный гемостатический эффект зарегистрирован у животных, у которых применялся хитозан – биосовместимый полисахарид, обладающий уникальными гемостатическими свойствами. В этой группе объем кровопотери по сравнению с контролем заметно уменьшился на 47,2%, что эквивалентно почти двукратному уменьшению кровопотери. Этот результат указывает на высокую эффективность хитозана в остановке кровотечения и его потенциал для использования в клинической практике.

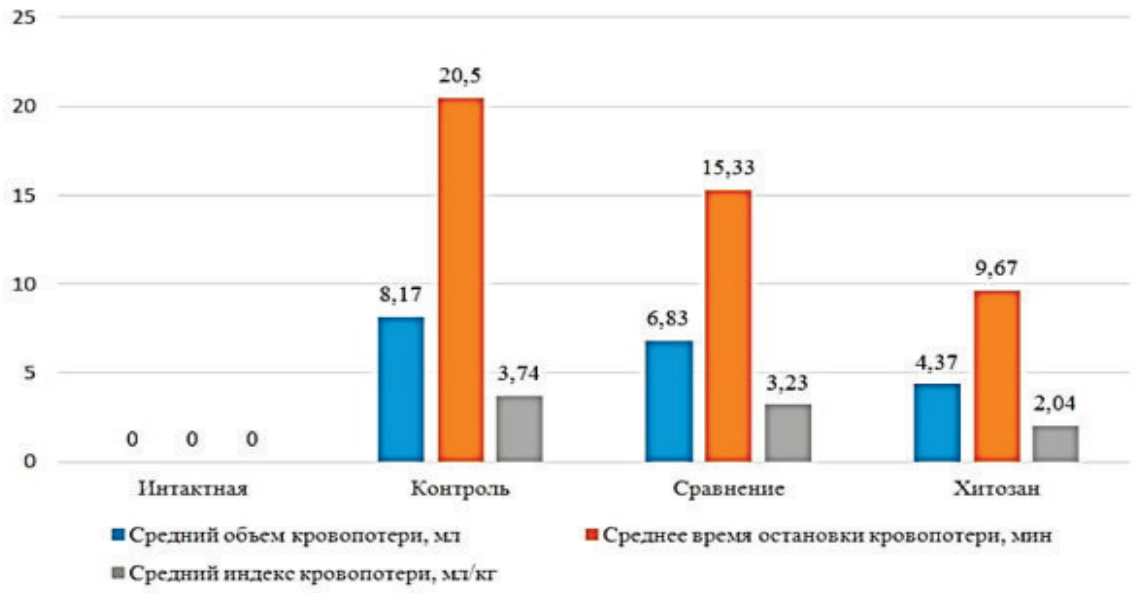


Рис. 3. Гемостатические показатели у экспериментальных животных.

Помимо оценки объема кровопотери, было измерено время остановки кровотечения. У жвиотных интактной группы, как и в случае с объемом кровопотери, время остановки кровотечения отсутствовало. У кроликов контрольной группы, у которых было спровоцировано кровотечение, среднее время остановки кровотечения составило 20,5 минуты. У животных группы сравнения, получавших стандартное лечение, время остановки кровотечения по сравнению с контролем сократилось на 25,2%, что указывает на положительное влияние стандартного лечения на скорость остановки кровотечения. Однако наиболее значительное сокращение времени остановки кровотечения отмечалось у животных, получавших хитозан: по сравнению с контролем оно сократилось на 52,8%, что свидетельствует о значительно более быстром действии хитозана в остановке кровотечения.

Для более точной оценки кровопотери, учитывающей размер животного, был рассчитан средний индекс кровопотери, который представляет собой объем кровопотери, выраженный в миллилитрах на килограмм массы тела (мл/кг). В контрольной группе средний индекс кровопотери составил 3,74 мл/кг. У животных группы сравнения, получавших стандартное лечение, индекс снизился на 13,6%, что указывает на умеренное снижение кровопотери, соотнесенной с массой тела. Наиболее значительное снижение индекса кровопотери было зафиксировано у животных, получавших хитозан – на 45,5% по сравнению с контролем. Это подчеркивает, что хитозан не только уменьшает общий объем кровопотери, но и оказывает более выраженное влияние на кровопотерю, соотнесенную с размером животного, что может быть особенно важно при оценке эффективности гемостатических средств в различных клинических ситуациях.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил статистически значимые различия между группами по всем параметрам с уровнем значимости $p<0,0001$.

Для оценки значимости различий между конкретными группами, участвовавшими в исследовании, применялся парный t-тест Стьюдента – широко распространенный статистический метод, позволяющий сравнивать средние значения двух независимых выборок и определять, являются ли эти различия статистически значимыми. Выбор этого теста обусловлен тем, что данные, полученные в ходе эксперимента, соответствовали требованиям нормального распределения, что является одним из основных условий корректного применения t-теста.

Результаты статистического анализа показали, что животные, получавшие лечение с применением хитозана, кролики группы сравнения статистически значимо отличаются от контроля (животные, которые не получали никакого специфического гемостатического вмешательства) по всем изученным показателям, включая объем кровопотери, время остановки кровотечения, а также показатели свертываемости крови, такие как время свертывания и время реканализации. Уровень статистической значимости для всех этих показателей был ниже 0,01 ($p<0,01$), что указывает на высокую вероятность того, что наблюдаемые различия не являются случайными и обусловлены именно воздействием хитозана или используемого метода сравнения. При этом наиболее интересным оказался факт, что животные, у которых применялся хитозан, показали наиболее выраженный гемостатический эффект, существенно превосходя группу сравнения по всем параметрам ($p<0,001$). Это указывает на то, что хитозан обладает более высокой эффективностью в остановке кровотечения по сравнению с используемым методом сравнения, что может быть связано с уникальными свойствами хитозана, такими как его способность к быстрому образованию геля при контакте с кровью и его биосовместимость.

Результаты, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о высокой эффективности хитозана в снижении кровопотери и ускорении гемостаза. В частности, средний объем кровопотери у животных, получавших хитозан, по сравнению с контролем был в два раза меньше, что позволило значительно уменьшить риск развития гиповолемического шока и других осложнений, связанных с массивной кровопотерей. Время остановки кровотечения также уменьшилось более чем в 2 раза, что позволило сократить время хирургического вмешательства и снизить риск повторного кровотечения. Для сравнения, у животных контрольной группы среднее время остановки кровотечения составило, например, 15 минут, в то время как в группе хитозана – всего 7 минут. Эти данные подтверждают перспективность использования хитозана как локального гемостатического средства в травматологии и ортопедии, особенно в ситуациях, когда требуется быстрое и эффективное прекращение кровотечения, например, при переломах, разрывах сосудов или операциях на органах с высокой кровоточивостью. Хитозан, благодаря своей способности формировать плотный гелеобразный слой, эффективно блокирует капилляры и мелкие сосуды, предотвращая дальнейшую кровопотерю.

Гемостатический эффект хитозана (и его производных, включая сульфат хитозана) при интраоперационной кровопотере можно объяснить, главным образом, его катионными свойствами и способностью к физическому образованию барьера.

Хитозан – это природный полисахарид, который в физиологических условиях (или после модификации) имеет положительный заряд (за счет свободных аминогрупп). Эритроциты (красные кровяные тельца) и тромбоциты имеют на своей поверхности отрицательный заряд.

Механизм действия хитозана в качестве гемостатика можно объяснить электростатическим взаимодействием (агглютинацией). При контакте с кровью положительно заряженный хитозан электростатически притягивает отрицательно заряженные эритроциты и тромбоциты [3]. Это приводит к их быстрой агглютинации (склеиванию) и образованию устойчивого сгустка-пробки непосредственно в месте кровотечения. Этот механизм может работать независимо от классического каскада свертывания крови.

Кроме того, хитозан является гидрофильным полимером и обладает высокой способностью к поглощению жидкости. При нанесении на рану он быстро поглощает воду и компоненты плазмы из крови. Это приводит к его набуханию и образованию вязкого, адгезивного геля или физического барьера, который закупоривает поврежденный сосуд и помогает остановить кровотечение [1,4].

Кроме физического притяжения, хитозан может также способствовать активации тромбоцитов, ускоряя процесс формирования тромба.

Сульфат хитозана является модификацией, которая может улучшить растворимость или другие свойства исходного хитозана, делая его более эффективным в определенных условиях. Используемый в нашем случае сульфат хитозана, обладает небольшой степенью замещения – 0,66%, поэтому принципиальный механизм действия, связанный с катионными свойствами, сохраняется.

Заключение

Местное применение хитозана значительно улучшает показатели гемостаза при моделировании кровопотери, что делает его перспективным препаратом для клинического использования в профилактике и лечении интраоперационного кровотечения. Полученные результаты позволяют рекомендовать дальнейшие исследования, направленные на оптимизацию дозировки и способа применения хитозана, а также на изучение его эффективности в различных клинических ситуациях. В частности, необходимо провести клинические испытания с участием пациентов, чтобы подтвердить эффективность и безопасность хитозана в реальных условиях. Учитывая его биосовместимость и доступность, хитозан может стать ценным инструментом в арсенале хирургов и травматологов, способствуя снижению смертности и улучшению качества жизни пациентов, страдающих от кровопотери. Дальнейшие исследования также могут быть направлены на разработку новых форм хитозана, например, в виде порошков, губок или пленок, для более удобного и эффективного применения в различных хирургических процедурах.

Литература

1. Аксельрод БА и др. Клиническое использование эритроцитсодержащих компонентов донорской крови. Гематол и трансфузиол.2018;63(4):372-435.
2. Бенько АН и др. Лечение травматических дефектов мягких тканей конечностей в условиях влажной среды. М 2015.
3. Жирова ТА. Современные подходы к обеспечению безопасности периоперационного периода при эндопротезировании тазобедренного и коленного суставов. Дис. канд. мед. наук. М 2016.
4. Тулупов АН. Тяжелая сочетанная травма. М 2015.
5. Banasiewicz T et al. Principles of minimize bleeding and the transfusion of blood and its components in operated patients-surgical aspects. Polski Przegląd Chirurgiczny.2023;95(5).
6. Barannyk S et al. Clinical Significance of Pathophisiologocal Changes in the Body of the Victim as a Result of Bleeding and Blood Loss. Innovative trends of science and practice, tasks and ways to solve them. The XXV International Scientific and Practical Conference. Athens (Greece) 2022:253-60.
7. Gheorghiță D et al. Chitosan-based biomaterials for hemostatic applications: a review of recent advances. Int J Mol Sci.2023;24(13):10540.
8. Novikov M, Smith CE. Fluid and blood therapy in trauma. Trauma Anesthesia.2015:113.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕСТНОГО ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КРОВОПОТЕРИ ВО ВРЕМЯ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ КРУПНЫХ СУСТАВОВ

Асилова С.У., Тухтапулатов А.Т., Милушева Р.Ю., Рахманова В.Н., Ахмедова Д.Б.

Цель: *оценка эффективности местного гемостатического препарата на основе хитозана в моделировании интраоперационной кровопотери с оценкой*

объема кровопотери, времени гемостаза и индекса кровопотери. ***Материал и методы:*** *исследование проведено на 24 взрослых кроликах, разделённых на четыре группы по 6 животных в каждой: интактная (без травмы и кровопотери), контрольная (модель кровопотери без лечения), группа сравнения (стандартное лечение) и группа с применением хитозана. Моделирование кровопотери осуществлялось путем стандартизированного хирургического вмешательства на конечностях. В ходе эксперимента фиксировались масса животного, объем кровопотери, время остановки кровотечения и индекс кровопотери, рассчитанный как отношение объема кровопотери к массе (мл/кг).* ***Результаты:*** *местное применение хитозана значительно улучшает показатели гемостаза при моделировании кровопотери, что делает его перспективным препаратом для клинического использования в профилактике и лечении интраоперационного кровотечения. Учитывая его биосовместимость и доступность, хитозан может стать ценным инструментом в арсенале хирургов и травматологов, способствуя снижению смертности и улучшению качества жизни пациентов, страдающих от кровопотери.* ***Выводы:*** *в дальнейшем исследования могут быть направлены на разработку новых форм хитозана, например, в виде порошков, губок или пленок, для более удобного и эффективного применения в различных хирургических процедурах.*

Ключевые слова: *эндопротезирование крупных суставов, модель кровопотери, гемостатические средства, хитозан.*

Сведения об авторах

Асилова Саодат Убаевна, д.м.н., проф. Ташкентский международный университет Киме и ТГМУ.

Тухтапулатов Алишер Тохирович, врач травматолог-ортопед Ташкентской городской клинической больницы скорой медицинской помощи.

Милушева Раки Юнусовна, НИИ химии и физики полимеров.

Рахманова В.Н., НИИ химии и физики полимеров

Ахмедова Дилафруз Бахадировна, – Ташкентский государственный медицинский университет.