

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

УКПП

№ держреєстрації № 0116U006817

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
(СумДУ)

40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2

тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58

e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
д-р. фіз.-мат. наук, професор

_____ Чорноус А.М.

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Розроблення та дослідження засобів місцевого призначення з
гемостатичними властивостями для невідкладної допомоги та хірургії

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЗАСОБІВ
МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ ДЛЯ ЗУПИНКИ КРОВОТЕЧІ
(остаточний)

Начальник НДЧ
канд. фіз - мат. наук, снс

Д.І. Курбатов

Науковий керівник
д-р.мед наук, доцент

М.В. Погорелов

2018

Рукопис закінчено 25 липня 2018 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол № 9 від 27 червня 2018 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол.наук. співроб., д-р.мед. наук, доцент	_____ (27.06.2018)	Погорелов Максим Володимирович (реферат, вступ, висновки, розділи 1,2,3)
Молодший наук. співроб.	_____ (27.06.2018)	Дейнека Володимир Миколайович (розділ 1,2,3)
Молодший наук. співроб., канд.мед.наук.	_____ (27.06.2018)	Олешко Олександр Миколайович (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	_____ (27.06.2018)	Гусак Євгенія Володимирівна (розділ 2, 3)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Дригваль Богдан Олександрович (розділ 2)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Козик Євгеній Володимирович (розділ 2)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Юсупова Азіза Фарходіївна (розділ 2)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Любчак Ірина Володимирівна (розділ 3)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Тищенко Анна Сергіївна (розділ 2)
Молодший наук. співроб.	_____ (27.06.2018)	Гапченко Андрій Валерійович (розділ 2)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Дєдкова Катерина Анріївна (розділ 2)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Гура Юлія Андріївна (розділ 2)
Молодший наук. співроб. д.вет.н.	_____ (27.06.2018)	Бергілевич Олександра Миколаївна. (розділ 2)
Лаборант	_____ (27.06.2018)	Дейнека Катерина Миколаївна (розділ 2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 52 с., 28 рис., 58 джерел.

ГЕМОСТАЗ, ХІТОЗАН, ОРГАНІЧНІ КИСЛОТИ, ПАРЕНХІМАТОЗНІ ОРГАНИ, КРОВОТЕЧА.

Об'єкт дослідження – гемостаз паренхіматозних органів.

Предмет досліджень – особливості гемостазу паренхіматозних органів (печінка) при застосування гітозанових губок на основі різних розчинників.

Мета роботи – створення гемостатичних засобів для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів із застосуванням хітозану на основі різних розчинників.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- Створення хітозанових губок з використанням різних органічних кислот (оцтова, аскорбінова, молочна);
- Використання «зшиваючих» агентів для формування стійких матеріалів;
- Оцінка фізико-хімічних та гемостатичних властивостей матеріалів *in-vitro*;
- Оцінка ефективності матеріалів на експериментальних тваринах.

Отримані дані щодо швидкості деградації гемостатичних засобів різного складу, визначена залежність ступеню та швидкості деградації в залежності від молекулярної маси хітозану та cross-linking агентів. Проведений експеримент дозволив вибрати оптимальний склад зразків та спланувати експеримент на модельних тваринах. В результаті експериментів на тваринах доведена високі гемостатичні властивості зразків з ацетату хітозану з додаванням транексамової кислоти та лактату хітозану, модифікованого кКар.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
2 ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ.....	17
3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	244
ВИСНОВКИ.....	456
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	46

ВСТУП

Адекватне гемостаз після травми і при хірургічних втручаннях є великою проблемою в сучасній медицині. Біля 40% травматичних і більше 90% бойових втрат відбувається на догоспітальному етапі. І біля 50% від цих смертей були зареєстровані у зв'язку з масивною крововтратою [1]. Біля 80% цивільних смертельних травм в США викликані неконтрольованою кровотечею. Крім того, крововилив у травматологічних хворих є основною причиною повторних операцій [2]. Успіхи в галузі біотехнологій привели до вибухового зростання кровоспинних препаратів в останні два десятиліття [3].

Hardean Achnesk класифікував всі місцеві гемо статичні засоби в кілька груп - фізичні агенти, синтетичні агенти, і кровоспинні пов'язки [4]. Останні є найбільш розповсюдженими для місцевого гемостазу у зв'язку з ефективністю і простотою використання. Кровоспинні засоби на основі хітину і хітозану є найбільш перспективними у зв'язку з ефективною зупинкою кровотечі і наявністю додаткових властивостей, таких як антибактеріальний ефект і стимуляція регенерації [5]. В даний час доступні більше 10 комерційних засобів на основі хітозану, які широко використовуються як в полі бою, так і для цивільної невідкладної допомоги.

Так доведено, що використання кровозупинного засобу на основі хітозану CELOX під час військової операції в Іраку, дозволило ефективно зупинити кровотечу у 90% поранень. При цьому не спостерігалось побічних ефектів та ускладнень навіть у віддалений період [6]. Доведене також зменшення гнійно-септичних ускладнень у військових після поранень, для зупинки кровотечі з яких використовували інший засіб медичного призначення на основі хітозану ChitoGauze [7].

Забезпечення адекватного гемостазу при травмі, таких органів як печінка, селезінка, нирки є складним завданням навіть в умовах операційної, коли звичайні хірургічні методи не завжди ефективні. Сьогодні в клінічній практиці для зупинки внутрішніх кровотеч непогано зарекомендували себе

препарати синтетичного та біологічного походження такі як: сульфокрилатні та ціанокрилатні клеї [8], матеріали на основі фібрину та тромбіну [9], проте вони мають чисельні протипокази та обмеження. Засоби для контролю гемостазу в паренхіматозних органах знаходяться на експериментальній стадії дослідження [10]. В Україні відсутні системні розробки в даній галузі.

Неконтрольована кровотеча є причиною більш ніж 50% смертей на полі бою та до 80% догоспітальних летальних випадків при травмуванні в мирний час. Кровотеча з паренхіматозних органів є однією з основних причин смерті при травмах печінки, нирок, селезінки та більш ніж 20% релапаротомій. Наявність доступного та ефективного засобу для зупинки кровотечі дозволяє знизити смертність удвічі та значно скоротити час перебування пацієнта в стаціонарі. На сьогодні в світі використовуються засоби на основі каоліну, цеоліту та хітозану для зупинки кровотечі на догоспітальному етапі та в умовах операційної, які показали високу ефективність при застосуванні у військовій та цивільній медицині. Проте, враховуючи складну схему виробництва та високу вартість препаратів, застосування даних засобів є економічно необґрунтованим в умовах вітчизняної медицини. Тому, основною проблемою, на вирішення якою спрямований даний етап дослідження – це створення високопористих засобів медичного призначення з ефективними гемостатичними властивостями.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Поранення і травми паренхіматозних органів є одним з найбільш важких видів хірургічної патології як в мирний, так і у воєнний час. При проникаючих пораненнях живота пошкодження печінки спостерігаються у 37%, а при закритій травмі живота - у 16% постраждалих [12]. Існуючі дані показують, що смертність при пошкодженні печінки коливається від 14 % до 80 % [13 - 14]. Травма паренхіматозних органів, як правило, ускладнюється кровотечею, характер якої визначається калібром пошкоджених судин: при їх діаметрі менше 2 мм частіше спостерігається паренхіматозна кровотеча при діаметрі більше 2 мм кровотеча профузна. Спроби надійно зупинити кровотечу можуть займати до 85% операційного часу [15]. У більшості госпіталізованих пацієнтів травма печінки була I – III ступеню тяжкості, їх успішно лікували консервативно. При травмі IV – V ступенів хірургічне втручання [16].

Складність зупинки кровотечі з ран печінки пояснюється незначною здатністю паренхіми до скорочення, відсутністю клапанів у венах, нездатність судин звужувати свій просвіт, місцевими розладами згортання крові в наслідок попадання у рану жовчі. Вона гальмує згортання крові за рахунок високої фібринолітичної активності. Фібринолітичні ферменти розчиняють у жовчних шляхах фібрин і цим самим підтримують прохідність жовчних шляхів, що значно ускладнює зупинку кровотечі при травмі органу [17-18]. Остаточний гемостаз при хірургічних втручаннях на паренхіматозних органах залишається складною і невирішеною до кінця проблемою.

За тривалий період розвитку абдомінальної хірургії розроблена величезна кількість інтраопераційних способів зупинки паренхіматозної кровотечі. Їх можна розділити наступним чином:

1. Фізичний:

- Механічний: тампонування, прошивання, накладання лігатур, кліпс;
- Вплив температурою (прикладання серветки з гарячими розчинами, заморожування, застосування гарячого пару);
- Електрокоагуляція (монополярна, біполярна);
- Лазерна коагуляція.

2. Хімічний:

- Зрошення розчинами (гемостатичними, судинозвужуючими, коагулюючими);
- Нанесення плівкоутворюючих гемостатичних препаратів (клеєві композиції) [19].

Один з перших розроблених методів – накладення гемостатичних швів М.М. Кузнєцова і Ю.Р. Пенського (1894), матрацні шви В.А. Опеля (1906), (1936), блоковидний шов Б.І. Альперовича (1955) та ін. Проте шовний матеріал прорізає тканину паренхіматозних органів, що може посилити кровотечу, а глибоко накладені повторні шви супроводжуються ішемією органу чи його частини з порушенням функції чи навіть некрозом. Окрім того, накладення швів не дозволяє швидко зупинити кровотечу. Для підвищення надійності печінкового шву широко застосовується оментопексія. Однак цей метод може призвести до запалення біля фіксуючих швів і до значного рубцювання пасма чепця, а також можливий його некроз з формуванням абсцесів [20].

У сучасній хірургії набув поширення метод електрокоагуляції, досить ефективний для зупинки кровотечі з судин невеликого діаметру. Проте даний метод не позбавлений побічних ефектів таких як, великі ділянки ушкодження тканин в зоні застосування, а саме формування опікового струпу (некрозу) глибиною близько 5 мм з можливим його відшаруванням і повторною кровотечею. Струм, що проводиться через пасивний електрод, може викликати внутрішні опіки, пошкодження судин і нервів, викликати

формування грубого рубця та виникнення спайкового процесу, що за часту призводить до порушення функції органів [21-22]

Відомі способи зупинки паренхіматозних кровотеч з використанням кріохірургічних методик, де в якості холодоагенту в кріоапаратах використовують тверду вуглекислоту, фреон і рідкий азот. Так створений кріоультразвуковою скальпель дозволяв забезпечувати гемостаз на капілярному рівні, проте мав ряд недоліків пов'язаних з дією низьких температур на тканини [23-24],[25]. На противагу кріохірургії для забезпечення гемостазу при розтині тканин стали застосовуватися плазмові потоки. Плазмові скальпелі і коагулятори використовують різні робочі тіла (аргон, гелій, водень), забезпечують розсічення і коагуляцію тканин за рахунок досягнення дуже високої температури плазменного потоку. Аргоноплазменні скальпелі показали високу ефективність у хірургії паренхіматозних органів. Однак використання комплексів, що працюють на основі плазмових потоків обмежене через високовартісне устаткування та сервісне обслуговування [26].

В даний час у хірургії для забезпечення гемостазу тканин широко використовується лазерне випромінення, що генерується різними типами лазерних скальпелів, - CO₂, алюмоітрієві-неодимові і т.д. Переваги даних скальпелів в одночасному розсіченні і коагуляції лазерним променем кровоносних і лімфатичних судин, мінімальна зона термічного пошкодження тканин, безконтактність інструменту, що особливо важливо у зв'язку з актуальністю проблеми ВІЛ-інфекції. До недоліків слід віднести наявність термічного опіку, що уповільнює процес регенерації тканин, а також високу вартість обладнання [27].

Незважаючи на ефективну хірургічну тактику та великий арсенал матеріально-технічного оснащення, що значно підвищили виживаність пацієнтів, все ще значною проблемою залишаються тяжкі ускладнення, як сепсис, некроз печінки, поліорганна недостатність [28-29].

Останнім часом все більшого поширення набувають місцеві гемостатичні матеріали через свою ефективність, доступність та простоту у використанні. 62 % опитаних хірургів гепатобіліарної зони відзначили, що постійно застосовують місцеві гемостатики, 33 % респондентів – рідко. У 27% для застосування обирали матеріали на основі фібрину [30].

Класифікація місцевих гемостатичних матеріалів:

Форма матеріалу	Тип матеріалу	Приклад
Тверді мембрани, губки, частинки, волокна.	Біополімери	Сухий фібриновий перев'язувальний матеріал із різними композиціями, матеріали на основі хітозану, колаген, желатин, окислена целюлоза, картопляний крохмаль гідрохлоридні волокна.
	Синтетичні полімери	Полігліколева кислота, полі 2-гідроксиетил метакрилат.
	Кераміка	Цеоліт та його похідні
	Полімер-керамічні композити	Хітозан-силікатні пов'язки, гранули альгинат та цеоліт, гранульовані комбінації мінерального смектиту та поліакрилату.
Рідкі герметики, дисперсні розчини.	Біополімери	Фібриновий герметик, хітозановий гель, желатин-тромбінова суспензія.

	Синтетичні полімери	Поліетиленгліколевий клей,
	Біо-синтетичні полімери	Желатин-полі (L-глутаміновї кислоти) клей.

Усі матеріали значно відрізняються за будовою, формою, способом застосування та механізмом дії, що ускладнює їх вибір.

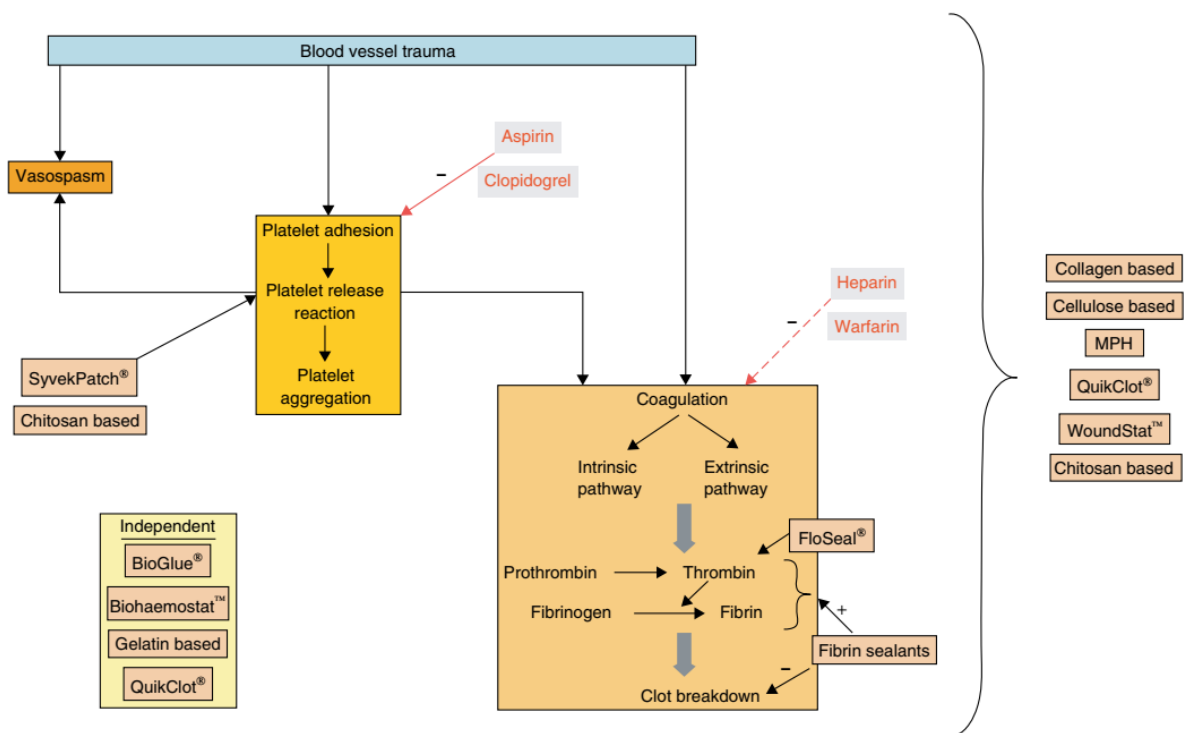


Рисунок 1.1 – Механізм дії гемостатичних матеріалів. (Н. Seyednejad, М. Imani, Т. Jamieson and А. М. Seifalian / Topical hemostatic agents // British Journal of Surgery 2008; 95: 1197–1225)

Ідеальний місцевий кровоспинний матеріал повинен мати такі характеристики: швидкий і ефективний контроль кровотечі в широкому діапазоні умов, від різних етіологічних факторів кровотечі, стійка тривалість гемостазу від декількох годин до днів, легкість застосування, простота стерилізації, просте зберігання, тривала стабільність, хороша біосумісність, апірогенність, відсутність алергізуючої дії, стимуляція регенераторних

процесів, бактерицидна, чи бактеріостатична дія, відсутність тромбоемболічних ускладнень [31].

Біополімери як типові місцеві гемостатичні засоби мають перевагу перед синтетичними та керамічними засобами, тому що повністю піддаються біодеградації. Вони включають в себе білки (фібриноген, тромбін, колаген, желатин, альбумін), і полісахариди (целюлоза, глюкозамін, хітозан). Вони можуть застосовуватись у вигляді пов'язок, губок, порошоків, чи гелів [32].

Білки фібриногену і тромбіну – два найбільш важливі білки коагуляції. Фібриноген, як великий розчинний білок, присутній в нормальній плазми. Це фібрилярний глікопротеїн з молекулярною масою 340 кДа. має дві ідентичні субодиниці зв'язані дисульфідними зв'язками і складається з трьох різних поліпептидних ланцюгів: Aa, Bb, і g, присутні в плазмі. Тромбін, важливий компонент крові, що відноситься до серинових протеїназ. Він каталізує багато реакцій пов'язаних зі згортанням крові. За наявності тромбіну, фібриноген піддається перетворенню у фібрин. Це один з головних процесів гемостазу. Спочатку фібрин є розчинний і чутливий до фібрінолітичної дії плазміну, проте після дії фактору XIIIa він перетворюється у нерозчинний фібрин [33-34].

Сухі кровоспинні пов'язки були підготовлені з різних комбінацій фібриногену і тромбіну від людини або тварин. Вони показали досить хороший кровоспинний ефект. Один з найвідоміших матеріалів TachoComb і TachoSil (Hafslund Nycomed Pharma AG, Відень, Австрія), що складається з тонкого шару ліофілізованої людського фібриногену, 4.3-6.7 мг/см², і бичачого тромбіну 1,5-2,5 МО/см² (у TachoSil застосовують людський тромбін), які диспергують в органічне середовище, і наносяться на одну сторону листа кінського колагену. 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. При попаданні препарату внутрішньосудинно можливі розвиток тромбоемболічні ускладнення, місцева реакція. TachoComb більш ефективний при малих чи помірних кровотечах [35], [36-37].

Колаген є ще одним біополімером, який відіграє важливу роль в місцевому гемостазі. Відомо не менше 25 типів колагену. Типи I, III були вивчені для контролю крововтрати. Вони містять три поліпептидних ланцюги. Стверджується, що колаген зупиняє кровотечу через аналогічний шлях у якості фізіологічного гемостазу. Колагенові структури є фактором активації тромбоцитів в плазмі крові та призводять до їх адгезії та агрегації і утворення стабільного тромбоцитарного згустку. Колаген також індукує активацію інших факторів згортання крові. Крім того, сухий колагеновий концентрат під час гемостазу активно адсорбує плазму та формені елементи крові, забезпечуючи механічну тампонаду. Колаген переважно застосовується у поєднанні з іншими гемостатичними матеріалами і слугує матрицею у вигляді мікрофібрилярного порошку чи пластини. Незважаючи на можливі негативні наслідки, у результаті застосування колагену, як чужорідного білка, виявилось, що матеріали на основі колагену не показали високу ефективність при значній кровотечі [38-39].

Желатин ще один біополімер, що використовується для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів. Це білковий продукт отриманий шляхом часткового гідролізу колагену взятого зі шкіри, кісток, хрящів, зв'язок тварин. Природні молекулярні зв'язки між окремими нитками колагену руйнуються з утворенням желатину, що складається в основному з проліну і гідроксипроліну. Желатин плавиться при нагріванні і твердне при знову охолодженні. Разом з водою утворює напівтверду речовину – колоїдний гель. Більшість гемостатичних желатинів на основі твердої речовини, що має

губчату структуру. Gelfoam (Upjohn, Kalamazoo, MI, США) – основний продукт на основі желатину. Але поряд з високою вартістю даної продукції, її не можна застосовувати при значній парнихіматозній кровотечі [40-41].

Інша група біополімерів, що використовується для створення місцевих гемостатичних засобів – карбонові окислені полісахариди. Основний представник даної групи – окислена целюлоза у вигляді тканної чи нетканної гемостатичної пов'язки. Отримання окисленої целюлози можливе різними способами, залежно від окисника, в якості якого найчастіше використовується дінітроген тетраоксид фреону, діоксиду азоту в фторукарбонівому розчиннику. Після окиснення будь-яким методом, тканину ретельно промивають розчинником (чотирихлористий вуглець), потім водним розчином 50 % та 99 % ізопропілового спирту. Комерційний представник окисненої целюлози є «Surgicel»® Eticon. Використання даного матеріалу дозволяє швидко сорбувати рідку частину крові та концентрувати її формені елементи крові навколо місця ураження. Але це значно знижує рН у місці застосування, що може сприяти хімічному пошкодженню оточуючих тканин, утворенню прозапальних цитокінів та запальній реакції навколо пов'язки. Крім того, навколо гемостатичного матеріалу «Surgicel®» може виникати гранульоматозне запалення, що у деяких випадках призводить до утворення абсцесу [42-43].

Сучасним напрямком в розробці місцевих гемостатичних засобів є матеріали на основі хітозану. Хітозан – сополімер, який складається з β -(1→4)-зв'язаних 2-ацетамідо-2-дезоксид-Д-глюкопіранози та 2-аміно-2-дезоксид-Д-глюкопіранози одиниць. Його, як правило, одержують лужним деацетилюванням хітину, який є основним компонентом екзоскелету ракоподібних. Хітин за структурою дуже схожий на целюлозу, проте менш реактогенний. Деацетилювання хітину дає хітозан, відносно реакційну сполуку. Його виробляють у різних формах, таких як порошок, паста, плівки, волокна, гелі та губки. Хітозан розчинний у оцтовій, молочній, яблучній, мурашиній та янтарних кислотах [44]

Хітозан є псевдопластичним матеріалом і здатний підвищувати в'язкість у кислому середовищі. На в'язкість розчину хітозану також впливає молекулярна вага, ступінь деацетилювання, рН, іонна сила, концентрація та температура. В'язкість розчину зменшується внаслідок підвищення температури і збільшується при збільшенні концентрації хітозану. Вплив рН на в'язкість залежить від конкретного типу використовуваної кислоти [45].

Характеристики хітозану, необхідні для конкретного застосування, залежать від ступеню деацетилювання (ДА) та його молекулярної маси. Ступінь ДА молекулярного ланцюга хітину збільшується за рахунок підвищення температури або міцності лужного розчину. В'язкість хітозану також впливає на біологічні, особливо ранозаживляючі властивості, а також біодеградацію у лізоцимі [46].

Завдяки своїй катіонній природі хітозан є потужним антимікробним агентом з бактерицидним, чи бактеріостатичним ефектом залежно від структури [47]. Хітозан піддається біодеградації у результаті якої утворюються нетоксичні олігосахариди. Вони вступають у реакції метаболічних процесів та в подальшому виводяться з організму. Швидкість біодеградації хітозану залежить від молекулярної маси та періоду розпаду N-ацетил-D-глюкозамінових залишків і залежить від ступеня деацетилювання [48].

Гемостатична активність хітозану пов'язана з наявністю позитивних зарядів в основі його структури. Зокрема негативно заряджені мембрани еритроцитів та тромбоцитів крові взаємодіють з аміногрупами хітозану, що мають протилежний заряд. У результаті цієї реакції відбувається реорганізація та послаблення щільних білкових зв'язків, що пояснює ефект покращання проникності клітин при застосуванні даного полісахариду [49].

У зв'язку з вищезгаданими властивостями, хітозан є предметом багатьох досліджень медико-біологічних і фармацевтичних спрямувань. Зокрема, він використовується для контактних антисептичних засобів, у вигляді пов'язок,

ортопедичних та тканинноінженерних скафолдів, у якості матеріалу для доставки ліків [50].

Можна зробити висновок, що хітозан є перспективним матеріалом для подальшого вивчення та застосування з метою виготовлення тканинноінженерних конструкцій, перев'язувальних та місцевих гемостатичних матеріалів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Отримання губки

Для одержання гелю хітозану використовували хітозан із молекулярною масою 300 кДа та ступенем деацетилювання 82%, одержаний із панцирів камчатських крабів без будь-яких домішок. 2 % розчин хітозану готували розчинивши порошок хітозану в одному з органічних розчинників (оцтова, аскорбінова, молочна чи щавлева кислота), перемішували на водяній бані при 60 °С протягом 1 год до утворення однорідної суспензії. Розчин хітозану залишають при кімнатній температурі на добу без перемішування для дегазації розчину. До нього перемішуючи додавали 5% водного розчину транексамової кислоти (вагове співвідношення хітозану та транексамової кислоти 2:1). Розчин хітозану з транексамовою кислотою заморозували при -25 °С 24 год. і ліофільно висушували у вакуумі (0,1Па) при температурі +20.

2. Растрова електронна мікроскопія

Скануючу електронну мікроскопію проводили з використанням електронного мікроскопа REMMA102 (SELMІ, Україна) для отримання інформації про розподіл пор та структуру матеріалу. Щоб уникнути накопичення заряду на поверхні зразків, хітозанові губки покрили тонким (30-50 нм) шаром срібла у вакуумній кстановці VUP- 5M (SELMІ, Україна).

2.1.2 Визначення швидкості деградації губок

Для визначення швидкості деградації губку занурювали у розчин simulated body fluid (SBF) рН = 7,2 за температури 37 °С. Аналіз ранніх результатів проводили через 5, 15, 30, 60 хвилин, 1, 7, 14 діб після початку експерименту. Швидкість деградації (D) визначали за формулою (1):

$$D = \frac{W_0 - W_t}{W_0} 100\% ,$$

де W_0 – маса сухого зразка; W_t – маса зразка через проміжок часу t .

2.1.3 Дослідження сорбційних властивостей

Сорбційних властивості визначали шляхом занурення губки у розчин simulated body fluid (SBF) рН = 7,2 за температури 37 0С. Аналіз ранніх результатів проводили через 5, 15, 30, 60 хв і 1 год. Сорбцію (S) визначали за формулою (2):

$$S = W_0 - W_t$$

де W_0 – маса зразка до занурення; W_t – маса зразка через проміжок часу t.

2.1.4 Дослідження зміни рН

Визначення зміни рН в розчині SBF проводили через 5, 15, 30, 60 хв і 1 год. За допомогою рН-метр – рН-150МИ.

2.1.5 Визначення виходу транексамової кислоти

Вихід транексамової кислоти (A) в розчині визначали через 5, 15, 30, 60 хв і 1 год. і розраховували за формулою (3):

$$A = \frac{V_p}{V_t} \times 100 \%$$

де V_p - практичний вихід транексамової кислоти; V_t - теоретичний вихід транексамової кислоти.

2.2 Дослідження взаємодії губок на основі хітозану з кров'ю

Для дослідження було взято 80 мл крові здорових донорів віком 20 - 24 років за їх добровільної згоди. 60 мл було розміщено по 2,5 мл у вакутайнери Becton Dickinson Vacutainers®, що містили 3,6 мг EDTA для проведення клінічного аналізу крові та 0,109 М цитрату натрію для проведення коагулограми. З 20 мл було отримано еритроцитарну масу шляхом центрифугування для проведення реакції аглютинації еритроцитів.

2.2.1 Реакція аглютинації еритроцитів

Для визначення аглютинацію еритроцитів 0,5 мл хітозанового розчину переносили в 96-лунковий мікропланшет. Попередньо 5 мл еритроцитарної маси розводили в 95 мл фізіологічного розчину. В кожную лунку додавали 0,1

мл 5% еритроцитарної маси. Інкубацію проводили в термостаті при 37 ° С протягом 40 хв. Гемаглютинація оцінювалась за шкалою Ставицького:

- ++++ компактний гранулярний аглютинат;
- +++ плавний килимок на дні лунки зі складеними краями;
- ++ гладкий килимок на дні лунки, краї дещо обірвані;
- + вузьке червоне кільце навколо гладкого краю килимка;
- дискретний червоний гудзик в центрі лунки.

Інші форми були інтерпретовані як невизначені варіанти гемаглютинації.

2.2.2 Сорбція крові

Всі зразки після експозиції з людською кров'ю були видалені з вакутайнерів та зважені, щоб оцінити сорбцію крові. Вона визначалась використанням наступної формули (2):

$$S = W_1 - W_2;$$

де S - сорбція крові (мг); W1 - маса зразка після експерименту (мг); W2 - маса зразка до експерименту (мг).

2.2.3 Клінічний аналіз крові та коагулограма

У медичному центрі "Флоріс" на гематологічному аналізаторі CELL-DYN 3700 (ABBOTT, США) з використанням реагентів DIAGON (Угорщина) було визначено рівень гемоглобіну (HGB, g/L), еритроцити (RBC, T/L), тромбоцити (PTL, g/L), середній об'єм тромбоцитів (MPV, fL) та ширина розподілу тромбоцитів (PDW,%). Дослідження згортання крові проводилося на автоматизованому аналізаторі ACL 7000 (Instrumentation Laboratory, США) з використанням реактивів RecombiPlasTin 2G і SynthASil (HemosIL, США). Визначили протромбіновий час (PT, сек), індекс протромбіну (PI,%), міжнародне нормалізоване співвідношення (INR, EU), фібриноген (Fg, g/L) і активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ, с).

2.2.4 Визначення цитотоксичності та адгезивності з використанням культур фібробластів

Оскільки для синтезу хітозанових губок використовували різні розчинники, було проведено дослідження губок на культурі фібробластів для оцінювання адгезії та проліферації клітин на поверхні зразків. Дослідження виконано в лабораторії клітинної і тканинної інженерії компанії Пауа (Київ). Для цього з губок були виготовлені блоки діаметром 10 мм, які розміщували у 12-лунковому планшеті. Попередньо диски були простерилізовані іонізуючим випромінюванням в дозі 25 кГр. На поверхню кожного диска було поміщено 50 000 клітин (фібробласти – OF). У кожен лунку додавали 2 мл модифікованого середовища Ігла (DMEM medium), планшет поміщали в CO₂-інкубатор, заміну середовища здійснювали кожні 3 дні. Адгезії та ріст фібробластів оцінювали за допомогою мікроскопії.

Цитотоксичність губок досліджували комбінованим методом – фарбуванням флюоресцеїн діацетатом та пропідіумом йодидом (FDA/PI). Одним з методів оцінки цитотоксичного ефекту біоматеріалів є визначення інгібуючого ефекту на активність цитоплазматичного ферменту неспецифічної естерази. Вона є одним з індикаторів життєздатності клітин. За допомогою молекулярного флуоресцентного зонда (FDA) визначали активність ферменту.

FDA не флуоресцентний, але при потраплянні в цитоплазму клітини в присутності неспецифічної естерази відщеплюються молекули діацетату і утворюється флюоресцеїн. Інтенсивність зеленої флуоресценції пропорціональна його кількості, що відповідає активності ферменту та життєздатності клітини.

PI – флуоресцентний фарбник який здатний зв'язуватись з ДНК, але він може проникати лише в неживу клітину через пошкоджену при некрозі мембрану. В результаті отримуємо червону флуоресценцію загиблих клітин.

2.3 Дослідження ефективності матеріалів

Особливості місцевого гемостазу печінки вивчали на 22 білих лабораторних щурах – самцях зрілого віку (180 – 200 гр) та 10 кролях – самцях породи «Шиншила» зрілого віку (3 – 3,5 кг). Під час проведення досліджень усі тварини перебували в однакових умовах. У віварії підтримували сталу температуру, постійне освітлення; рівень шуму та інших сторонніх чинників не виходив за рамки встановлених норм. Утримування тварин та проведення експериментів відбувалися згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Гельсінською декларацією Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000).

Щури були розділені на 2 групи: I група позитивний контроль, II група експериментальна. Експеримент проводили під внутрішньовенним кетаміновим наркозом (10 мг/кг) лабораторну тварину укладали на спину, фіксували за чотири кінцівки на предметному столику, голили передню черевну стінку. Після обробки операційного поля 70 % розчином етилового спирту виконували верхньосерединну лапаротомію до 1,5 см довжиною. В рану виводили ліву бокову частку печінки, в основі якої за допомогою біопсійного панчу DERMO-PUNCH® діаметром 4 мм. наносили дефект на всю товщу паренхіми.

Контрольній групі щурів місцевий гемостаз проводили використовуючи мембрани Tachocomb.

Кровотечу у експериментальній групі тварин зупиняли шляхом аплікації хітозанової губки на ділянку кровоточивої поверхні паренхіми пошкодженої частки печінки. Після зупинки кровотечі лапаротомну рану пошарово зашивали вузловими капроновими швами.

Упродовж усього терміну проведення експерименту тварин щодня оглядали, відмічали їх загальний стан, активність, стан лапаротомної рани. Тварин виводили з експерименту на 3-тю добу після завдання травми, для підтвердження ефективності гемостазу.

Для оцінки ефективності місцевого гемостазу, реакції оточуючих тканин та вивчення морфофункціональних особливостей регенерації печінки в умовах експерименту, використовували наступні методи дослідження.

2.4 Гістологічне дослідження

Для виготовлення гістологічних препаратів забирали ліву бокову частку печінки у якій розміщувався дефект з губкою. Шматочки біопсії фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (рН 7,2) впродовж 1 доби, потім зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафінові блоки. Серійні зрізи виготовлялися товщиною 5–7 мкм, які після депарафінації забарвлювали гематоксилін-еозином. Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа «Olympus BH 2» з цифровою відеокамерою DCM 510 5,0 pixels. Фотографії зберігали на жорсткому диску з подальшим друком кольорових зображень.

Реакцію паренхіми на присутність губки оцінювали з урахуванням комплексу морфологічних показників, що характеризують наявність та ступенем інтенсивності процесу запалення, особливостями розладів кровообігу; формування грануляційної тканини.

2.5 Статистичні методи

Статистичну обробку цифрових даних проводили за допомогою програми SPSS Statistica 21.0 (trial version). Нормальність розподілу перевіряли за допомогою одновибіркового критерію Колмогорова – Смирнова. Порівнювали середні величини, використовуючи t-критерій для незалежних вибірок. Достовірною вважали різницю при $t \leq 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Згідно з даними літератури властивості та будова матеріалів із хітозану залежать від таких параметрів, як молекулярна маса, ступінь деацетилювання та походження самого хітозану [51]. В нашому експерименті ми використовували хітозан зі ступенем деацетилювання 82 %. Молекулярною масою 300 кДа, в концентрації 2 %. Саме за таких параметрів створена хітозан набуває гемостатичних властивостей [52]. У дослідженні ми використовували різні типи губок, з розчинів хітозану в 1 % оцтовій кислоті, 1 % молочній кислоті, 2 % аскорбіновій кислоті, 5 % щавлевій кислоті. Кожен вид губки в одному випадку був модифікований агентами для «зшивання» полімерів, а в іншому був поєднаний з транексамовою кислотою, що є специфічним інгібітором фібрinolізу.

Растрова електронна мікроскопія поверхні матеріалу показала, що губки мають складну топографію, і їх будова залежить від виду органічної кислоти. Так, при розчиненні в молочній кислоті губки мали більш виражений гребінчастий рельєф, за винятком застосування кКар, проте мали меншу пористість у порівнянні з ацетатом та аскорбатом хітозану. Оксалат хітозану мав на своїй поверхні сконцентровані на своїй поверхні солі щавлевої кислоти у вигляді тонких, циліндричної форми кристалів.

Застосування «зшиваючих» агентів є необхідним для створення стабільних матеріалів, які здатні до тривалого зберігання (більше року) та повільної біодеградації. Знаходження матеріалу в рані упродовж 5-10 днів (повільна біодеградація) необхідна для забезпечення стабільного гемостазу після первинної зупинки кровотечі.

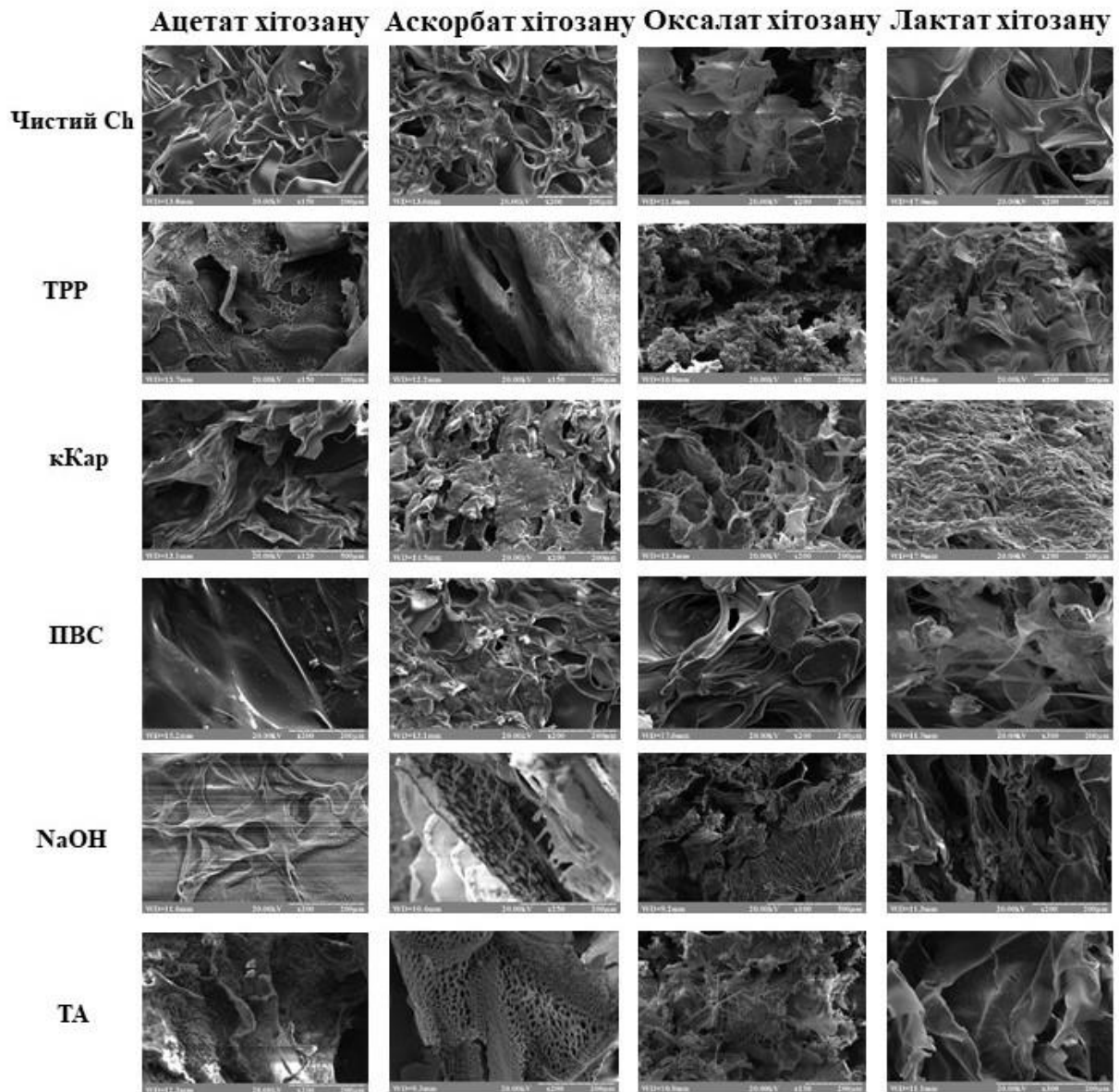


Рисунок 3.1 – Растрова мікроскопія зразків на основі хітозану залежно від використаних агентів.

Аналіз розподілу розмірів пор показало наявність в основному макропор розміром від 500 до 1200 мкм в матеріалах на основі молочної та аскорбінової кислоти. Оцтова кислота призводить до формування пор меншого діаметру – від 150 до 400 мкм, що з одного боку підвищує ефективну поверхню сорбції, з іншого – уповільнює деградацію матеріалу при дії фізіологічних розчинників.

Таблиця 3.1 – Сумарний об'єм відкритих пор (см³/г), вирахований по зміні об'єму спирту.

Агент Вид	Чистий	ТРР	кКар	ПВС	NaOH	ТА
Ацетат хітозану	40 ± 0,3	37 ± 0,1	35 ± 0,2	39 ± 0,5	33 ± 0,2	42 ± 0,3
Лактат хітозану	14 ± 0,5	15 ± 0,2	12 ± 0,6	18 ± 0,5	13 ± 0,3	10 ± 0,1
Оксалат хітозану	20 ± 0,2	22 ± 0,3	28 ± 0,4	24 ± 0,5	19 ± 0,2	21 ± 0,3
Аскорбат хітозану	25 ± 0,3	23 ± 0,2	29 ± 0,5	22 ± 0,3	20 ± 0,2	25 ± 0,5

Таким чином, оптимальними з точки зору будови є губки, синтезовані з використанням оцтової кислоти.

Специфічного ферменту розщеплення хітозану – хітинази в організмі людини немає [53]. Неспецифічну дію можуть виявляти деякі протеолітичні та гідролітичні ферменти. Визначення швидкості деградації губок показало їх залежність від виду органічного розчинника хітозану.

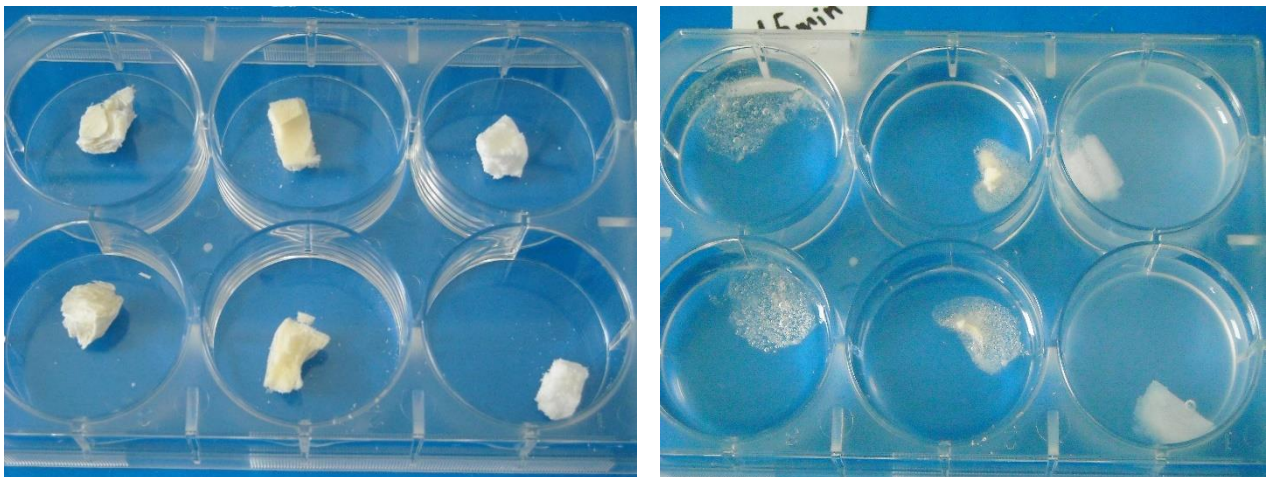


Рисунок 3.2 – Дослідження деградації губок у розчині SBF, А – зразки губок до занурення, Б – зразки губок у розчині SBF.

Деградацію губок проводили в розчині SBF, що за рН та іонним складом є найбільш подібним до плазми крові та інтерстиціальної рідини [54].

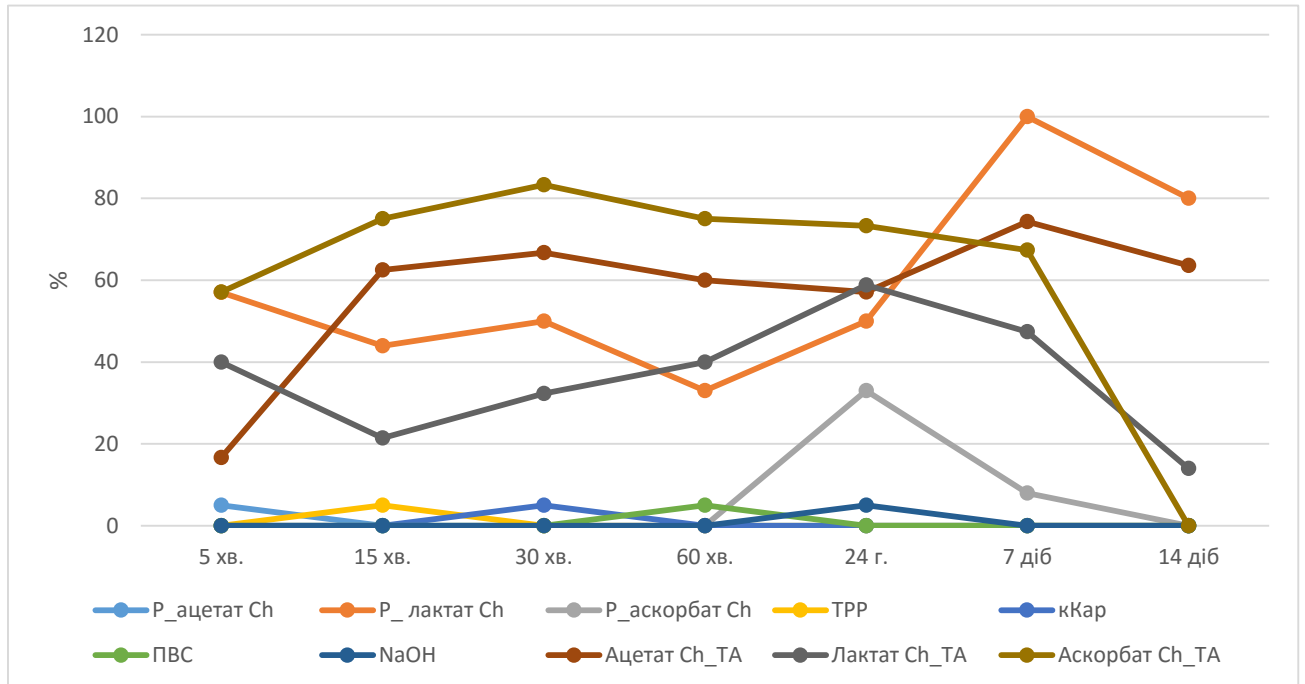


Рисунок 3.4 – Дослідження деградації губок

Оксалат хітозану як чистий так і з додаванням ТА повністю розчинився через 5 хв. після занурення. Тому в подальшому його результати не враховували. Найбільша втрата маси ($83,3 \pm 1,1$ %) за перші 30 хв. виявилась у аскорбата хітозану з ТА. Після цього його деградація стабілізувалася. Губка повністю розчинилась на 14 день дослідження. Лактат хітозану з ТА за перші 5 хв втратив $40 \pm 0,5$ % маси, до кінця 24 годин вона поступово зменшувалась ще на $58,8 \pm 0,3$ %. Зразок практично повністю деградував на 14 добу. А чистий лактат хітозану найбільше деградував з 2 по 7 добу. Ацетат хітозану з ТА за перші 15 хв. втратив $62,5 \pm 0,9$ % маси. До кінця 14 діб його маса суттєво не змінилась. Чистий аскорбат хітозану почав деградувати лише на кінець першої доби, на 7 добу цей процес практично закінчився. Усі зразки які було «зшиті» не піддавались деградації протягом 14 діб. Чистий ацетат хітозану також проявив стабільність в зазначений період дослідження.

Сорбція рідини

Первинним механізмом гемостазу за умов застосування губок на основі хітозану є сорбція рідкої частини крові з формуванням згустку тромбоцитів та запуском каскаду гемостазу.

Як видно з графіку (рис. 2), найбільш адекватна сорбція рідини в експерименті характерна для матеріалів на основі молочної та аскорбінової кислоти як у чистому вигляді так і поєднанні з ТА та зшиваючими агентами. Проте один з найкращих результатів показав ацетат хітозану з транексамовою кислотою.

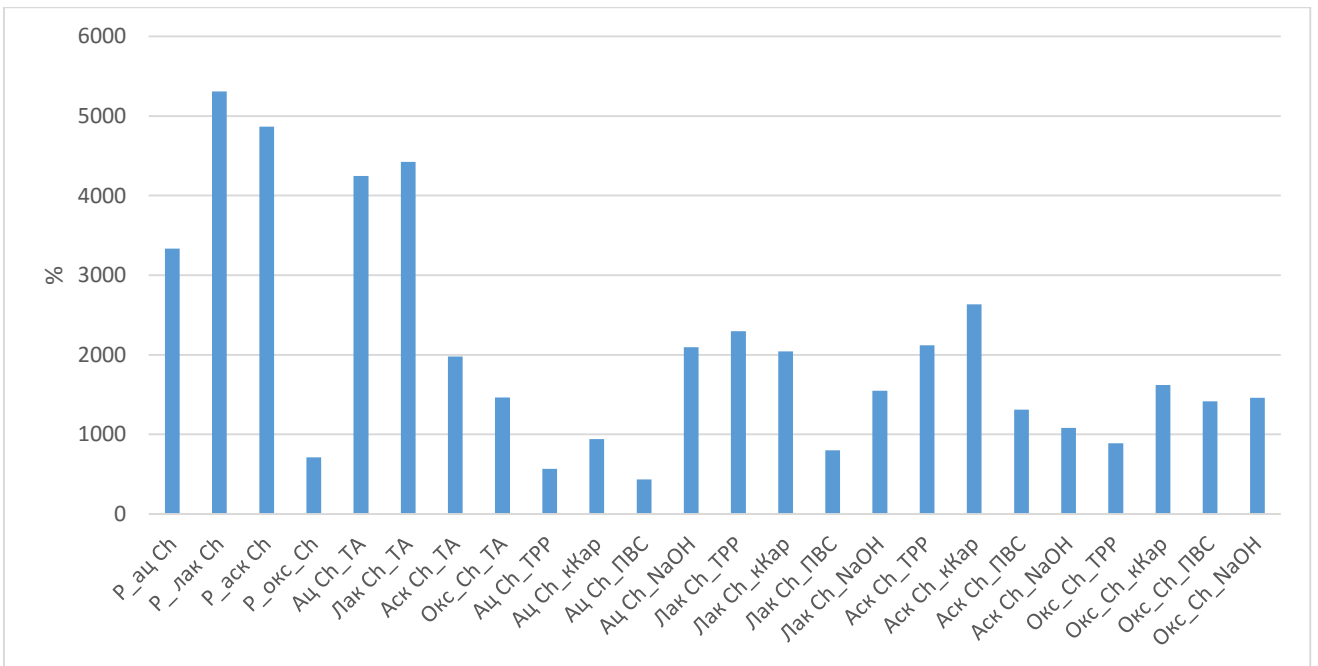


Рисунок 3.5 – Результати сорбційної активності матеріалів на основі



Рисунок 3.6 – Зміни рН через 10 хв. після занурення у розчин SBF

Чистий оксалат хітозану та його поєднання з ТА призводить до значної зміни рН в кислу сторону, що при використанні в реальних умовах в живому організмі може мати негативний вплив на оточуючі тканини. Решта зразків суттєво не змінювали даний показник.

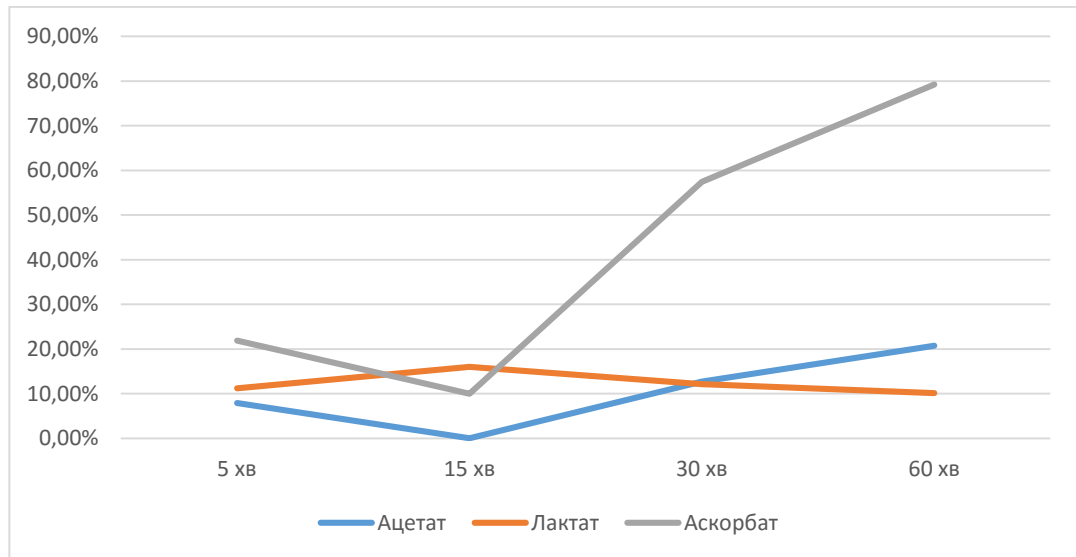


Рисунок 3.7 – Вихід транексамової кислоти після занурення в розчин SBF

Губки аскорбату хітозану свідчили про найбільший вихід транексамової кислоти, що на 5 хв становив $21,9 \pm 0,4$ %, а до кінця 60 хв збільшився до $79,2 \pm 1,4$ %. Ацетат і лактат хітозану показали подібну швидкість виходу транексамової кислоти за перші 30 хв, що відповідно становив $12,7 \pm 2,2$ % і $12,1 \pm 1,9$ %. Проте губка з ацетату хітозану на 60 хв. збільшила вихід транексамової кислоти на $20,7 \pm 1,6$ %, а для лактату вихід залишився сталим.

Оксалат хітозану через 5 хв деградації показав вихід транексамової кислоти $255,5 \pm 5,8$ мг/г ($77,4 \pm 0,9$ %).

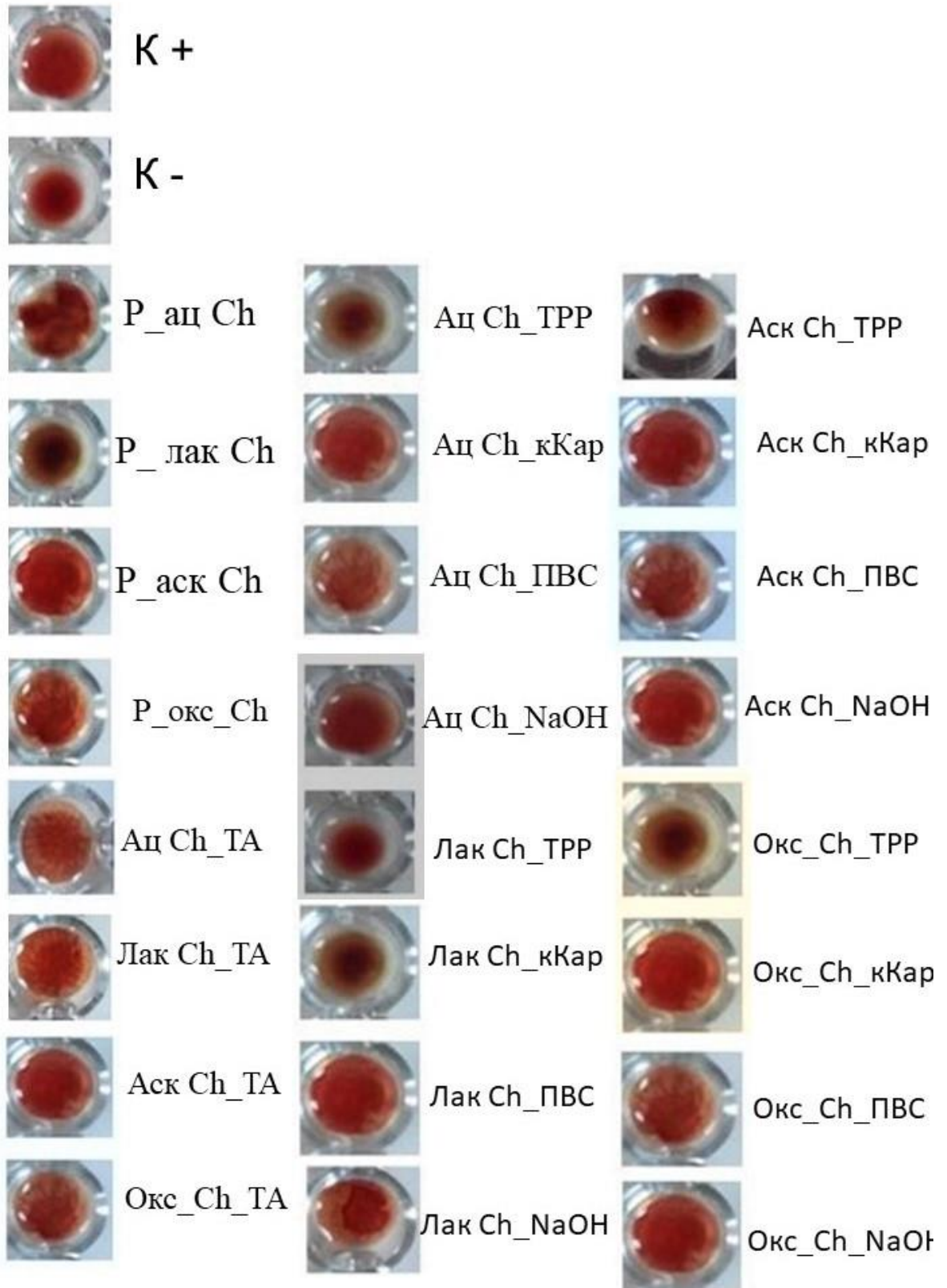


Рисунок 3.8 – Реакція аглютинації еритроцитів

За результатами реакції аглютинації еритроцитів найбільш ефективними виявились зразки на основі ацетату та аскорбату хітозану, що спричинили

аглотинацію рівну позитивному контролю. Гель на основі лактату хітозану мав найбільше сумнівних та негативних результатів.

Рисунок 3.9 – Сорбція крові

При взаємодії губок з кров'ю найбільшу сорбційну властивість показали губки лактату хітозану у поєднанні ТА, що через 10 хв. взаємодії з кров'ю у вакутайнері збільшили свою масу на $2325 \pm 2,5$ %. Також значну сорбційну властивість показали аскорбат та ацетат хітозану з ТА. Найменш здатний сорбувати рідку частину крові ацетат хітозану зшитий ПВС, що збільшив свою масу лише на $900 \pm 1,1$ %. Решта губок з різними видами «зшивок» показали подібні результати.

Губки ацетату хітозану з ТА за час експозиції формували на своїй поверхні щільний згусток, що достатньо міцно був прикріплений до зразка навіть після того коли губку діставали з вакутайнера.

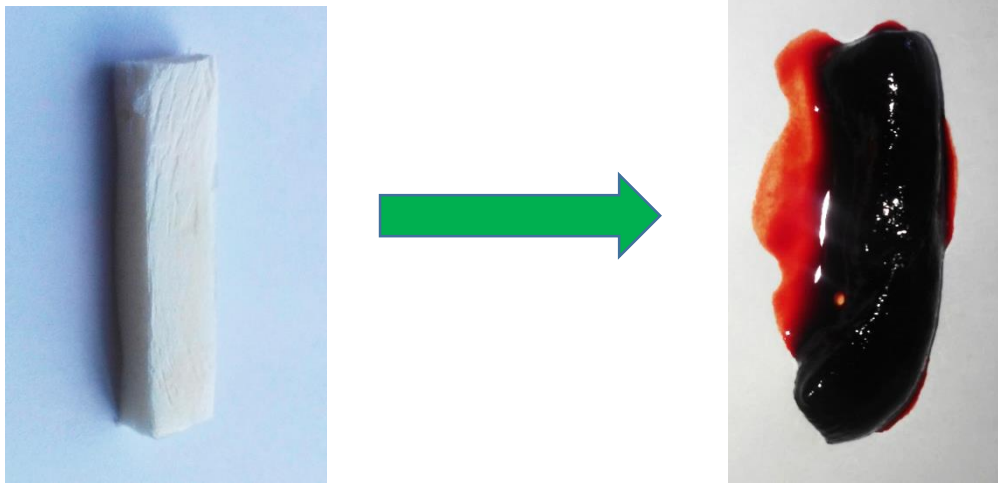


Рисунок 3.10 – Губка ацетату хітозану з ТА після взаємодії з кров'ю.

Реакція взаємодії з кров'ю допомагає визначити спроможність утворювати тромб без використання тваринних моделей. Таким чином нам вдається провести скринінг матеріалів, які будуть використані в експерименті на тваринах.

Основними показниками здатності утворювати тромб за умови контакту з кров'ю є зміна кількості тромбоцитів та їх морфологічних характеристик, зокрема їх об'єму.

Дані результатів крові після взаємодії з хітозановими губками показали, що кількість еритроцитів та лейкоцитів для усіх видів губок збільшилась порівнюючи з контролем, проте ця різниця була не достовірною ($p > 0,05$).

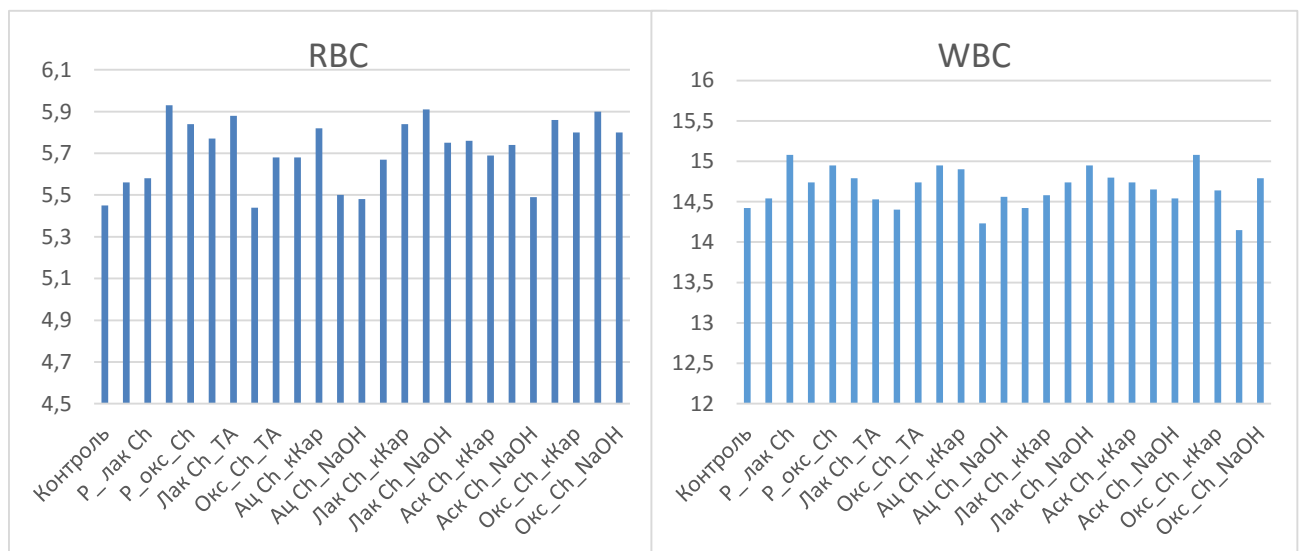


Рисунок 3.11 – Показники еритроцитів та лейкоцитів після взаємодії з кров'ю.

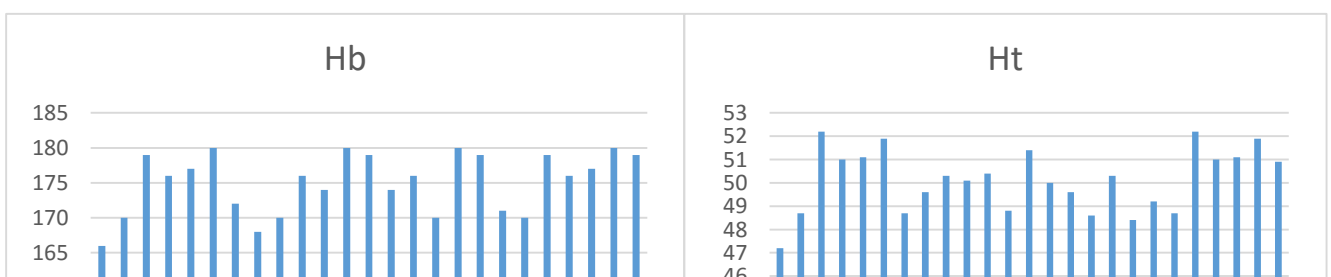


Рисунок 3.12 – Показники гемоглобіну та гематокриту після взаємодії з кров'ю.

Гематокрит та кількість гемоглобіну збільшилась для всіх зразків хітозанових губок у порівнянні з контролем ($p < 0,05$), що свідчить про сорбцію плазми крові. Різниця результатів між різними видами губок була не достовірна ($p > 0,05$).

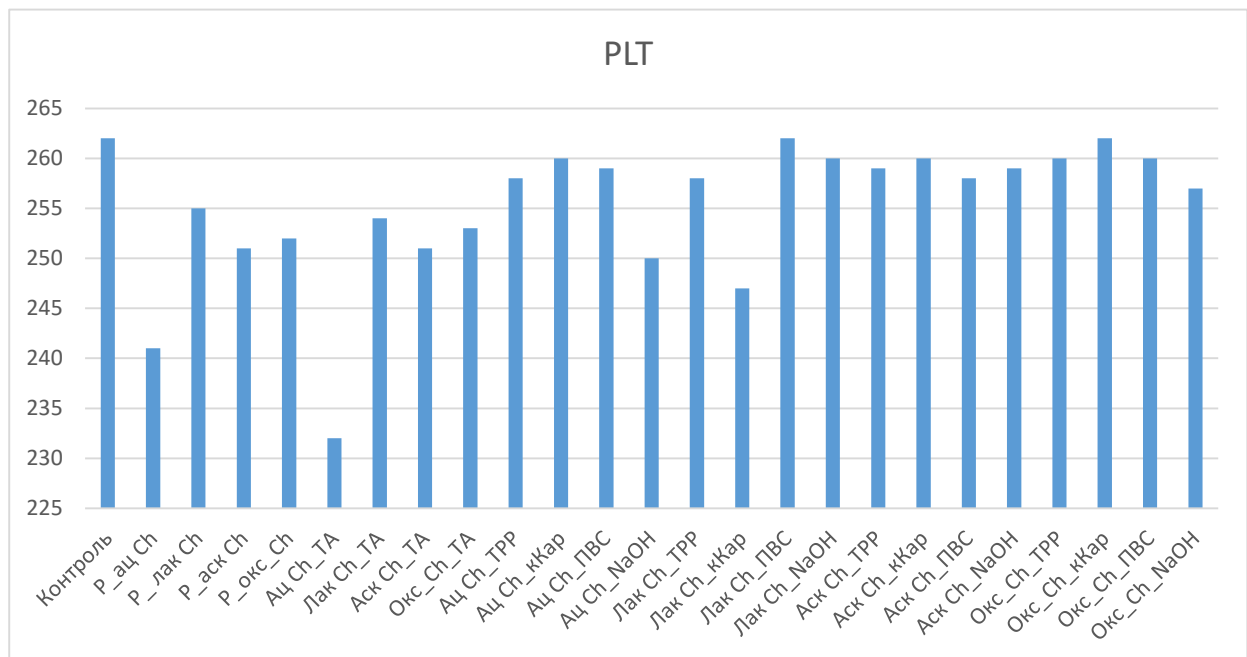


Рисунок 3.13 – Показники тромбоцитів, після взаємодії з кров'ю.

Зниження кількості тромбоцитів після реакції з кров'ю вказує на те що зразок губки здатний адгезувати та агрегувати на своїй поверхні дані клітини крові, що є необхідним у разі застосування даних зразків для зупинки кровотечі. Кількість тромбоцитів ацетату хітозану з ТА (232 ± 8 г/л), чистого ацетату хітозану (2241 ± 5 г/л) була суттєво нижча від контрольного зразка (262 ± 6 г/л) ($p < 0,05$). Інші зразки чистого хітозану та хітозану з ТА знижувал

кількість тромбоцитів, проте дана різниця була не достовірною ($p > 0,05$). Серед «зшитих» зразків до зниження кількості тромбоцитів поризводили лактат хітозану зшитий кКар, та ацетату хітозану зшитим NaOH, хоча різниця була також статистично не достовірною. Решта зразків взагалі не впливала на тромбоцити.

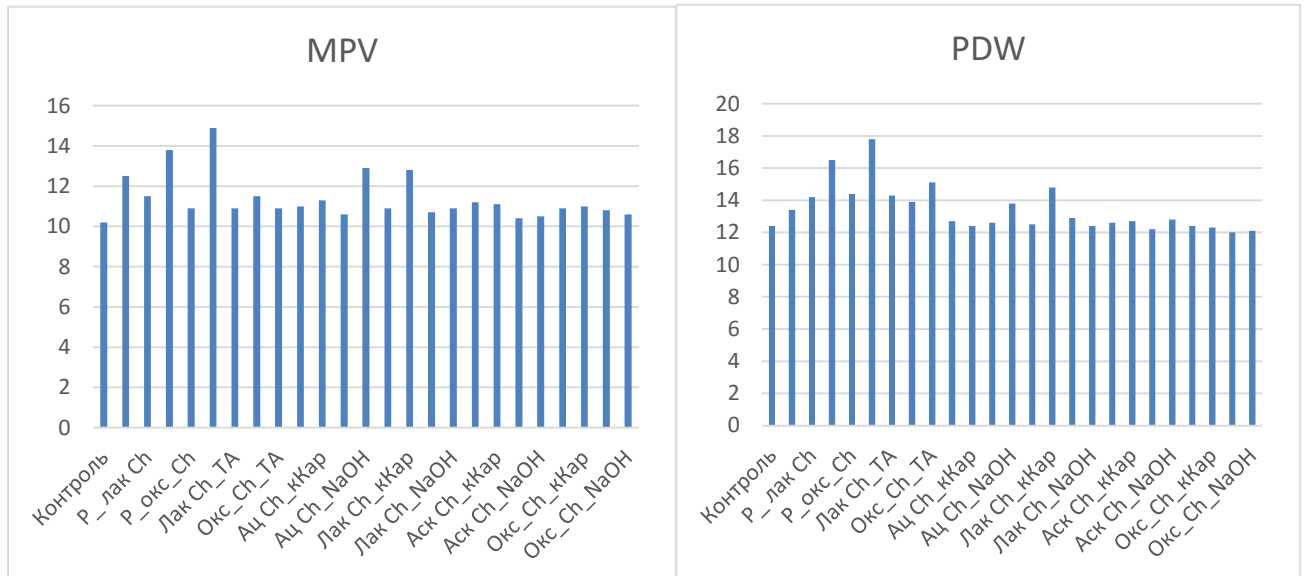


Рисунок 3.14 – Показники середнього об'єму тромбоцитів та ширини розподілу тромбоцитів після взаємодії з кров'ю.

Об'єм тромбоцитів та ширна розподілення тромбоцитів опосередковано свідчить про активацію тромбоцитів аналогічну реакції, що виникає після взаємодії тромбоцитів з колагеном I типу, який знаходиться у судинній стінці. А також набуття тромбоцитами морфологічних ознак дегрануляції при формуванні тромбу.

Так середній об'єм та ширина розподілення тромбоцитів достовірно збільшувався у ацетату хітозану з ТА ($14,9 \pm 0,4$ фл.) та ($17,8 \pm 0,3$) та чистого аскорбату хітозану ($13,8 \pm 0,2$ фл.) та ($16,5 \pm 0,2$) відповідно, де ($p < 0,05$), попри те що останній не суттєво знижував рівень тромбоцитів. Зразки чистого ацетату хітозану, лактат хітозану зшитий кКар, та ацетату хітозану зшитим NaOH також збільшували MPV та PDW, але результат достовірно не відрізнявся від контролю. Решта «зшитих» зразків взагалі не впливали на дані показники.

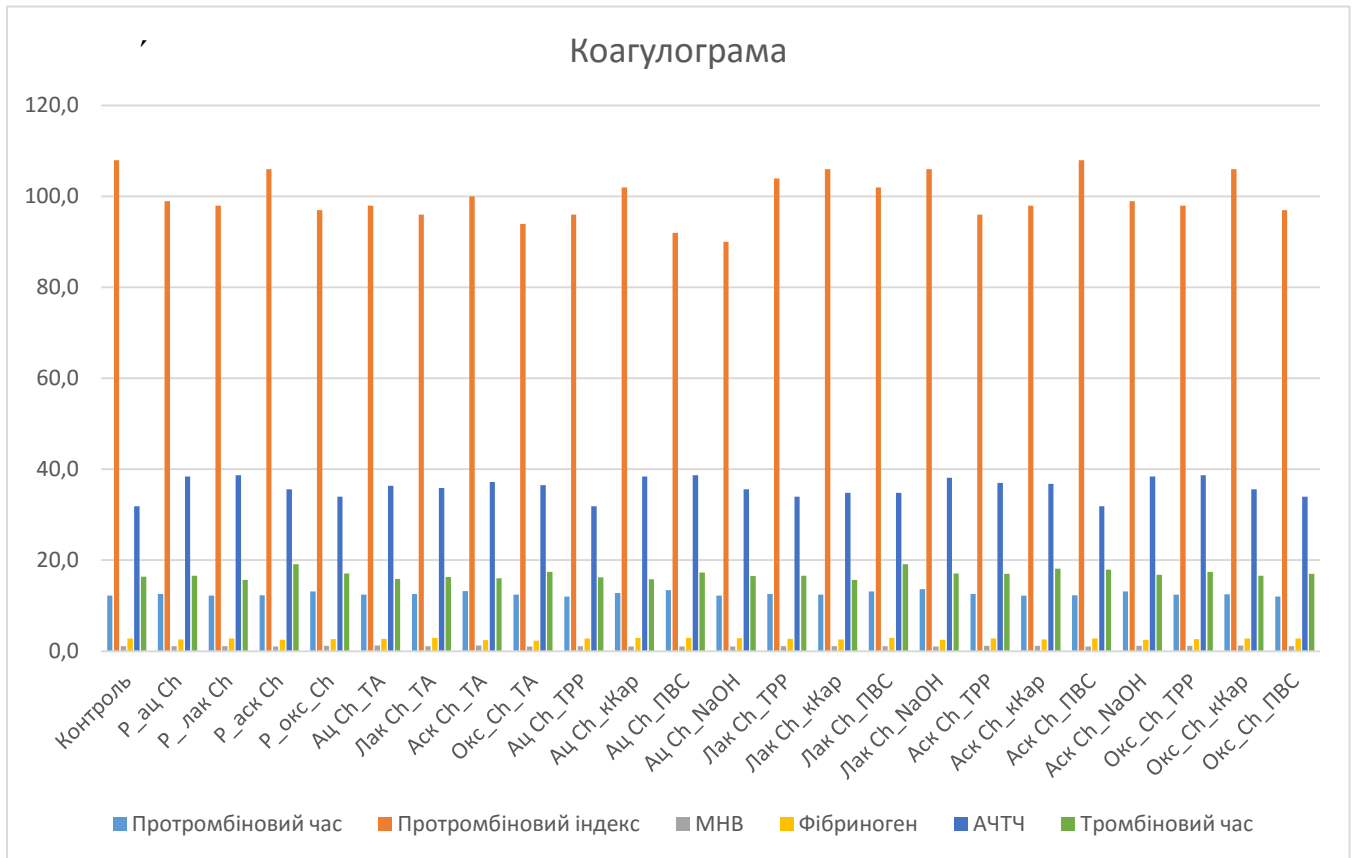


Рисунок 3.15 – Показники коагулограми після взаємодії з кров'ю.

За даними коагулограми жоден із зразків не показав статистично достовірних результатів у порівнянні з контролем. Це можна пояснити тим, що хітозанові губки здатні впливати лише на судинно-тромбоцитарну стадію гемостазу і не впливають на коагуляційний гемостаз. Дана властивість дозволяє застосовувати дані матеріали у пацієнтів з порушенням коагуляції.

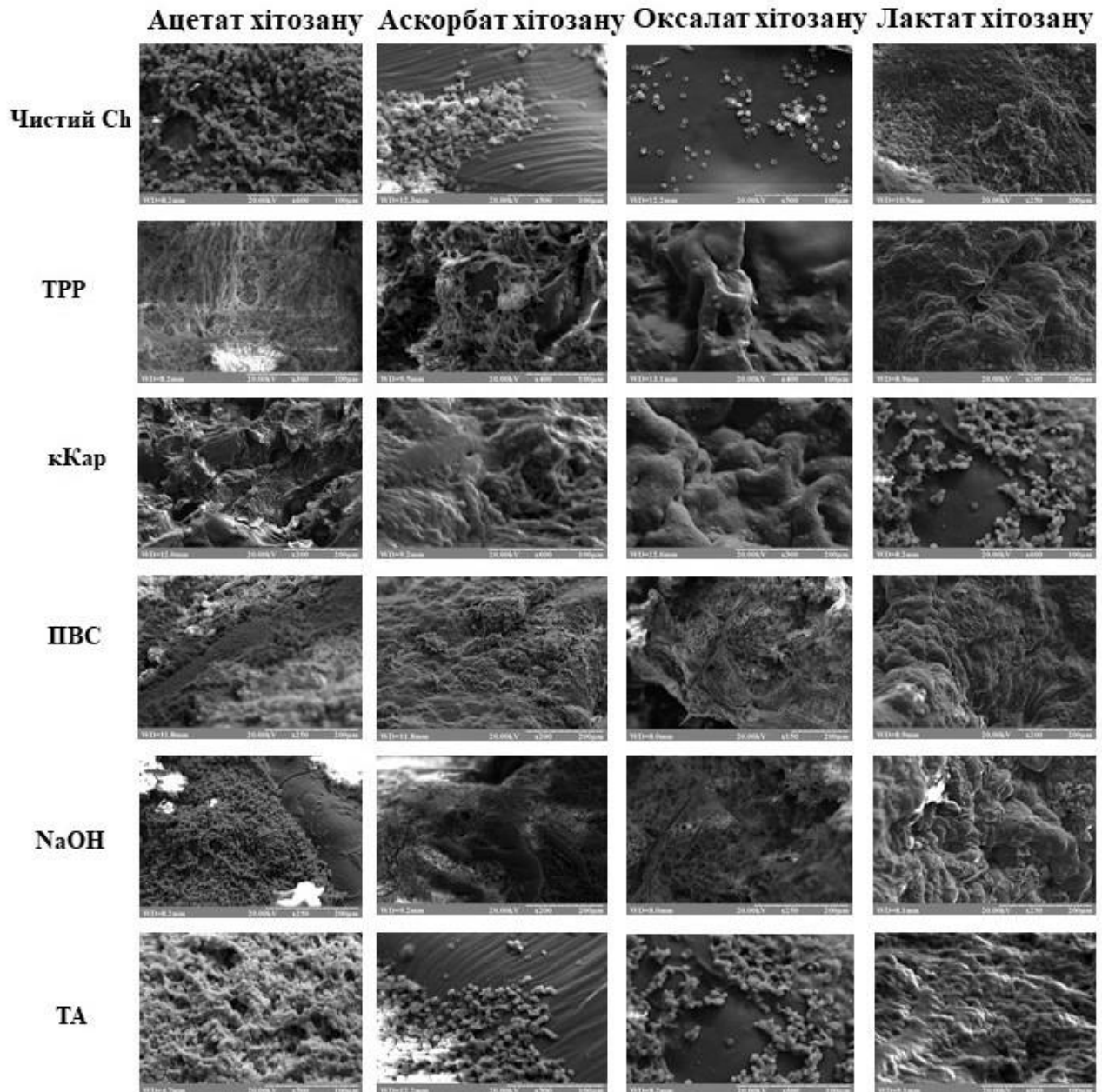


Рисунок 3.16 – Растрова мікроскопія поверхні губок після взаємодії з кров'ю.

Після взаємодії з кров'ю проведено дослідження поверхні хітозанових губок за допомогою СЕМ. На поверхні ацетату хітозану з ТА сконцентрована найбільша кількість еритроцитів та активованих тромбоцитів які з одної сторони прикріпились до губки, а з іншої утримують еритроцити утворюючи згусток. На поверхні аскорбату та оксалату хітозану з ТА можна спостерігати форменні елементи крові, проте у значно меншій кількості. На поверхні лактату хітозану знаходиться велика кількість адгезованих тромбоцитів, але

практично не видно зв'язаних з ними еритроцитів. Зразки з чистого хітозану теж мали на своїй поверхні формені елементи але у значно меншій кількості порівнюючи зі зразками з ТА. Ацетат хітозану мав найбільшу кількість еритроцитів та тромбоцитів.

Серед «зшитих» зразків проявили здатність до адгезії лише ацетат хітозану зшитий NaOH та лактат хітозану зшитий кКар. Вони мали на своїй поверхні невелику кількість еритроцитів. Решта зразків не мали адгезувальних властивостей.

«Зшиті» зразки мали найгірші результати в реакції взаємодії з кров'ю *in vitro*. СЕМ показала, що вони практично не мають адгезивних властивостей. А також 14 діб відсутності деградації робить дані зразки не придатними для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів, тому їх виключено з подальшого дослідження.

Цитотоксичність матеріалів

Визначення цитотоксичності матеріалів необхідне з метою визначення можливої токсичної дії продуктів деградації на оточуючі тканини в умовах застосування в клінічній практиці.

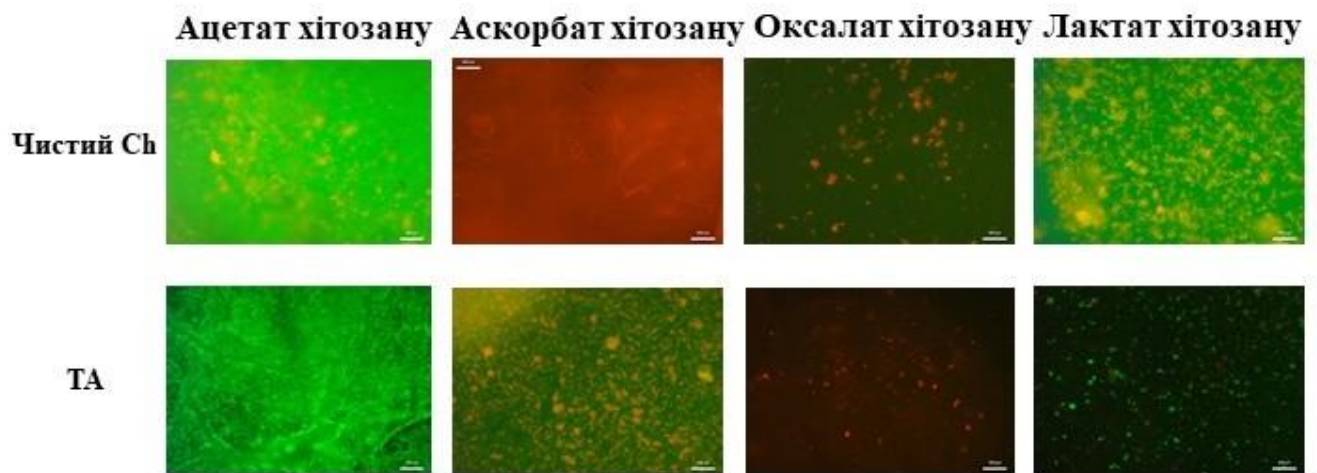


Рисунок 3.17 – Культура клітин фібробластів (OF) на поверхні хітозанових губок 7 днів від початку культивування. Комбіноване фарбування FDA/PI, x 100.

Дослідження цитотоксичності губок через 7 днів культивування свідчать, що губки ацетату хітозану з транексамовою кислотою не токсичні, високоадгезивні для культури клітин, а також сприяють росту та розпластуванню фібробластів на своїй поверхні.

Губки аскорбату та лактату хітозану з транексамовою кислотою проявили хорошу адгезивність, але мали помірний токсичний ефект, що призвело до загибелі від 35 до 45 % популяції фібробластів. Оксалат хітозану був абсолютно токсичним і призвів до повної загибелі культури клітин. Також він не проявив жодних адгезивних властивостей. Усі губки чистого хітозану показали токсичність і практично відсутність адгезії.

Таким чином, губки з чистого хітозану не підходять для наших цілей. Губки з оксалату хітозану показали цитотоксичну дію, тому не можуть бути використані в подальшому дослідженні. Незважаючи на наявність адгезивних властивостей у лактату хітозану, його цитотоксичність не дозволяє використовувати з гемостатичною метою. Аскорбат хітозану проявив хороші результати *in-vitro*, але має незначний цитотоксичний ефект. Також губка з даного матеріалу має нестабільну фізичну форму, що значно ускладнює її практичне застосування. Важливо, що аскорбат хітозану здатний піддаватись «старінню» і ще достеменно невідомо чи зберігаються його властивості з часом.

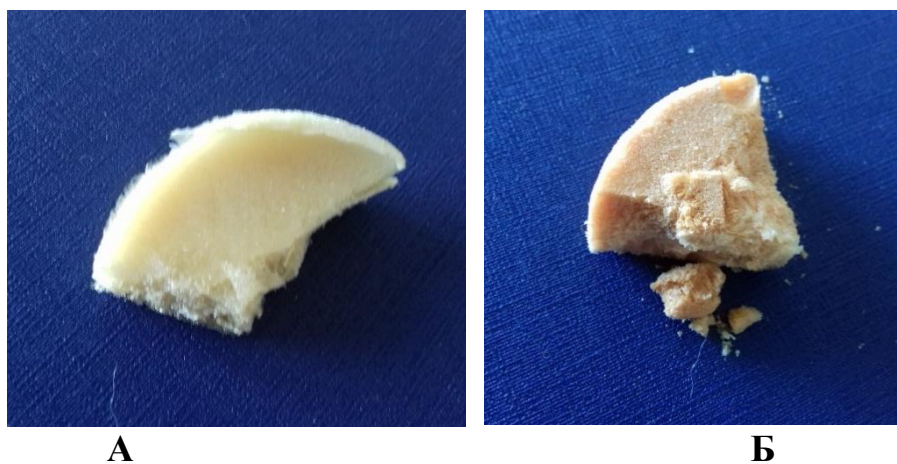


Рисунок 3.18 – Губка аскорбату хітозану А – після синтезу та Б – через 4 місяців.

Таким чином, після вивчення фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових губок, оптимальним варіантом для застосування в експерименті на лабораторних тваринах є матеріали з ацетату хітозану з транексамовою кислотою.

3.2 Результати дослідження на лабораторних тваринах

При моделюванні рани лівої частки печінки щурів виникала кровотеча при якій спонтанний гемостаз неможливий. Тому в дослідженні ми використовували лише позитивний контроль з використанням мембран «Tachocomb».

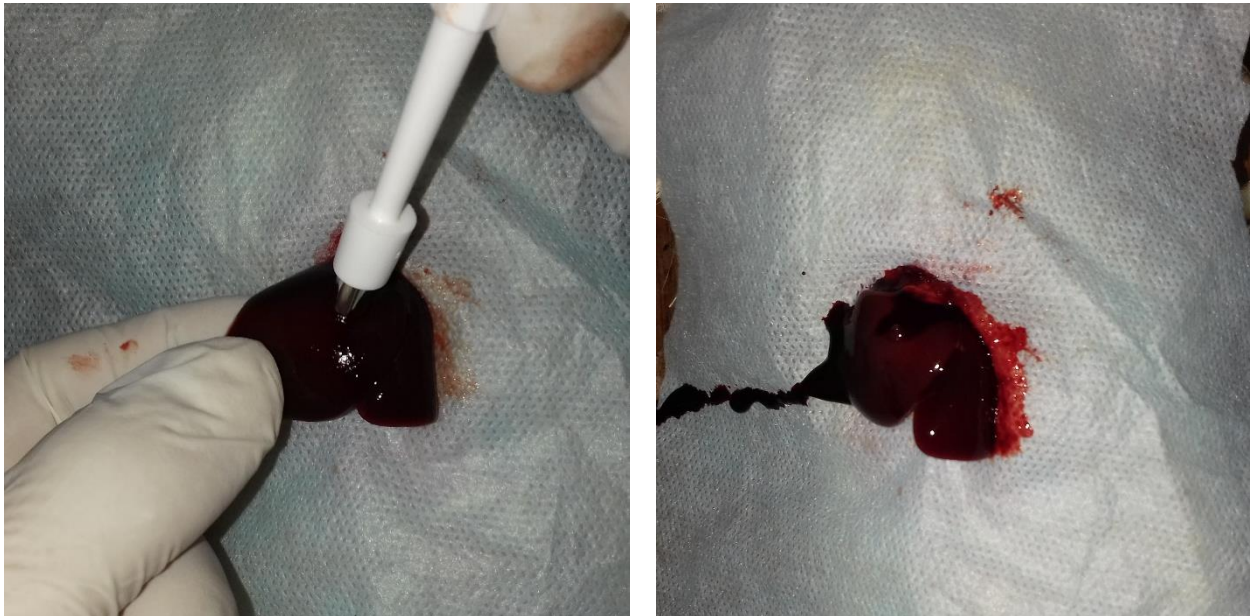


Рисунок 3.19 – Моделювання кровотечі з паренхіми лівої бокової частки печінки щура за допомогою біопсійного панчу.

При застосуванні губки з ацетату хітозану на моделі кровотечі з рани печінки щурів було встановлено, що кровотеча зупинялась за ($4,94 \pm 0,41$ хв.), що не суттєво відрізнялось від застосування мембрани Tachocomb ($4,78 \pm 0,5$ хв.) ($p > 0,05$).

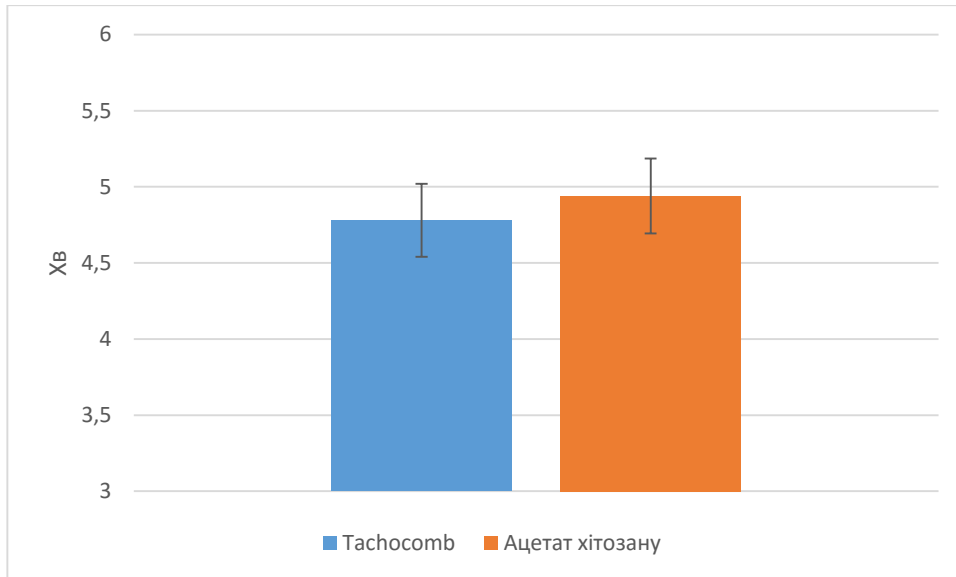


Рисунок 3.20 – Час зупинки кровотечі у щурів.

У всіх щурів, як дослідної так і контрольної груп кровотеча була зупинена в 100 % випадків ($p > 0,05$).

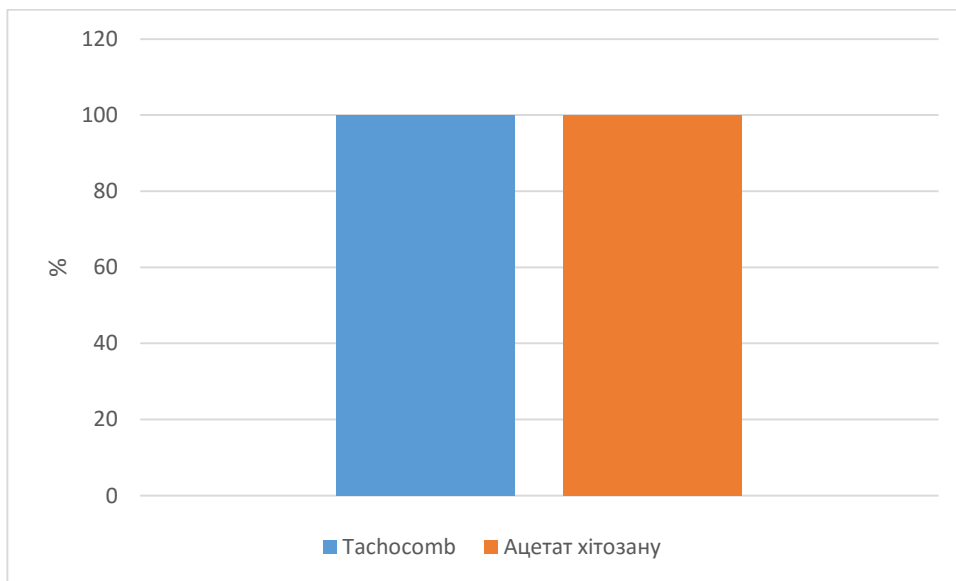


Рисунок 3.21 – Ефективність зупинки кровотечі у щурів.

Після зупинки кровотечі, як пластини Tachocomb так і губки ацетату хітозану залишали, лапаротомну рану пошарово зашивали.

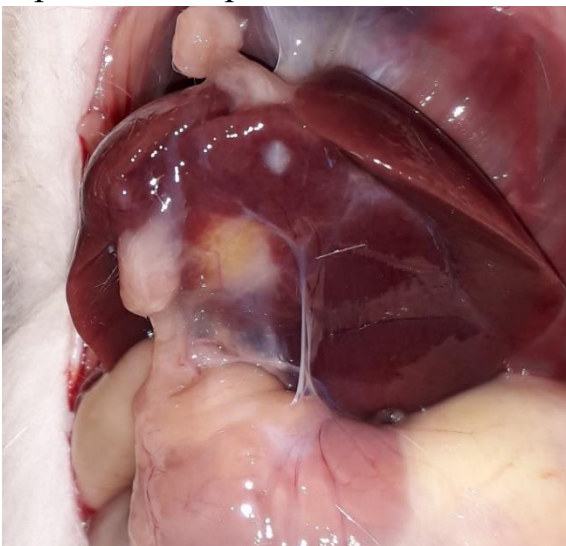


А

Б

Рисунок 3.22 – Частка печінки після зупинки кровотечі у щурів з використанням: А - пластини Tachocomb, Б – хітозанової губки.

Усі тварини обох груп на 7 добу було виведено з експерименту. Протягом цього періоду ніяких відхилень у поведінці чи харчових звичках виявлено не було. У однієї тварини контрольної групи був невеликий абсцес передньої черевної стінки без проникнення в черевну порожнину. У жодної з тварин ознак повторної кровотечі виявлено не було. Довкола травмованої частки печінки щурів обох груп був наявний злуковий процес, що обмежував чужорідний матеріал.



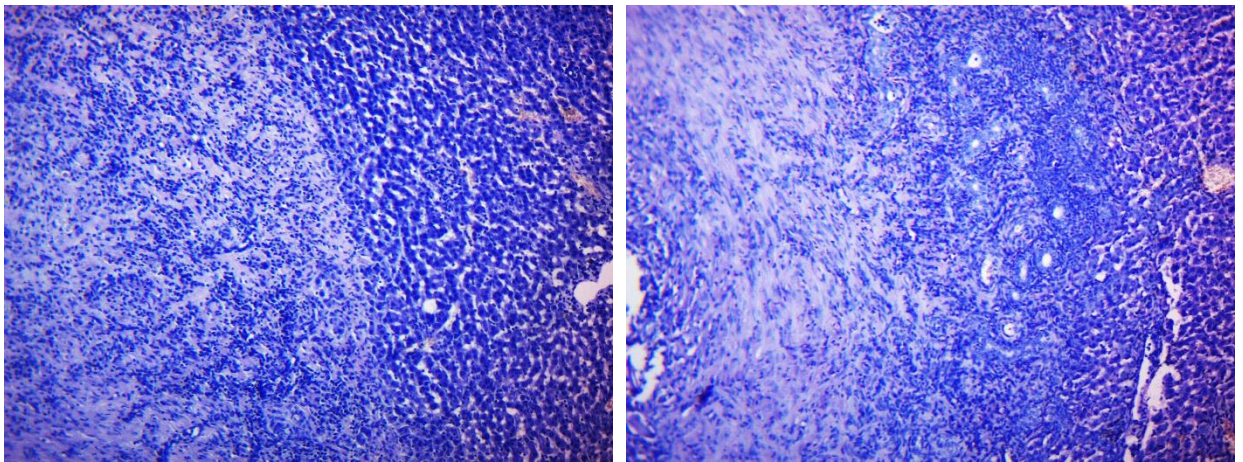
А

Б

Рисунок 3.23 – Печінка щурів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachocomb, Б – хітозанової губки.

Гістологічне дослідження показало, що для обох груп тварин довкола гемостатичних матеріалів було характерне формування помірної запальної

реакції. Мембрана Tachosorb істотно швидше піддавалась деградації макрофагами і менше впливала на оточуючу паренхіму печінки. Губки з ацетату хітозану через 7 діб залишали ще значну частину своєї маси. Викликали більш виражену запальну реакцію в порівнянні з контролем. Призводили до помірної дистрофії прилеглих гепатоцитів і гіпертензію у жовчовивідних каналцях.



А

Б

Рисунок 3.24 – Печінка щурів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachosorb, Б – хітозаної губки. Забарвлення гематоксилін-еозином. 36 x 100:

Для виключення ефекту тампонування та перевірки ефективності гемостатичних губок на основі хітозану на більшій тваринній моделі було змодельовано кровотечу з рани печінки кроля. Для цього після верхньосередньої лапаротомії в рану виводилась ліва медіальна частка печінки кроля. Паренхіму частки клиновидно висікали (близько третини загального об'єму частки) – виникала інтенсивна кровотеча.

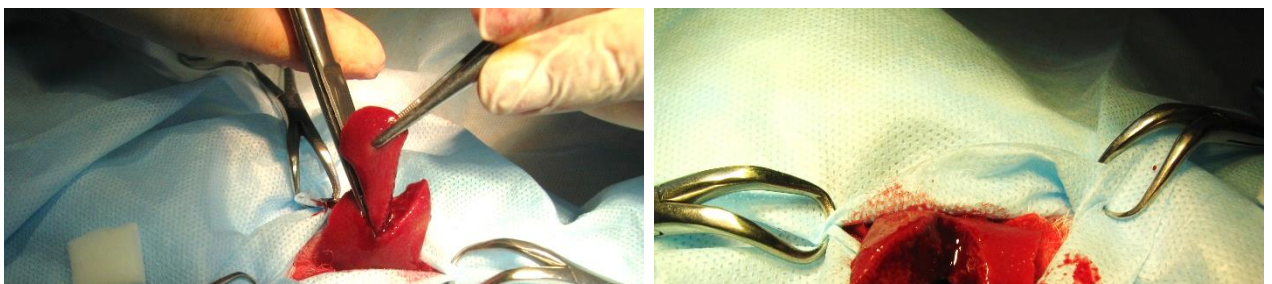
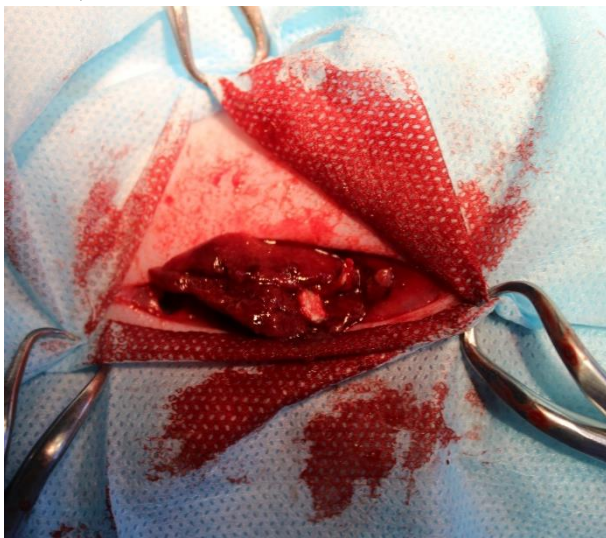
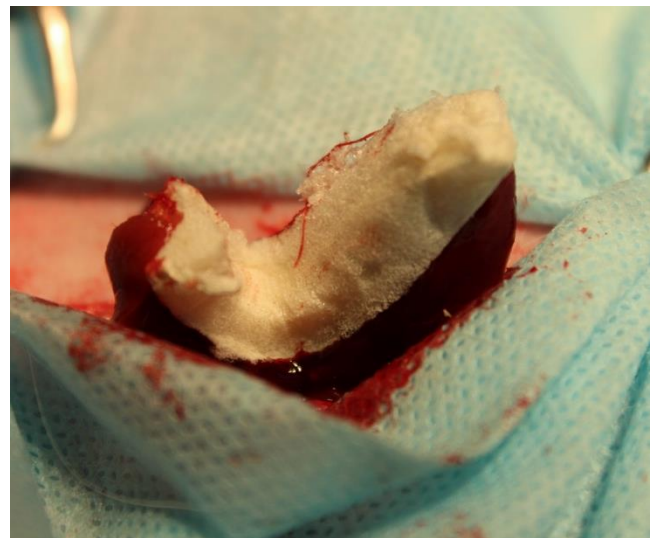


Рисунок 3.25 – Моделювання кровотечі з паренхіми лівої медіальної частки печінки кроля.

Кровотеча з отриманої рани печінки була зупинена у всіх тварин обох груп. У контрольній групі кровотечу зупиняли застосуванням мембрани Tachosorb, час зупинки становив $5,02 \pm 0,46$ хв. У експериментальній групі використовували губки ацетату хітозану з транексамовою кислотою. Гемостаз досягали через $5,11 \pm 0,37$ хв. Різниця між групами була не достовірною ($p > 0,05$).



А



Б

Рисунок 3.26 – Частка печінки після зупинки кровотечі у кролів з використанням: А - пластини Tachosorb, Б – хітозанової губки.

Після зупинки кровотечі матеріал залишали в рані. Лапаротомну рану пошарово зашивали. Через 7 діб тварин виводили з експерименту. Оцінювали загальний стан печінки та черевної порожнини, а також проводили забір матеріалу для гістологічного дослідження.

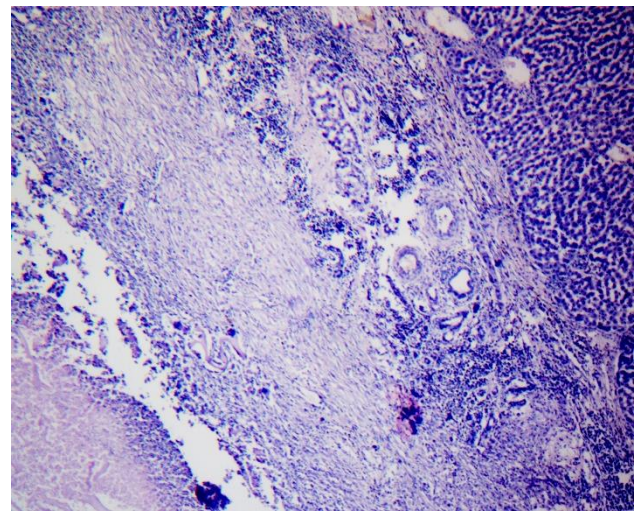
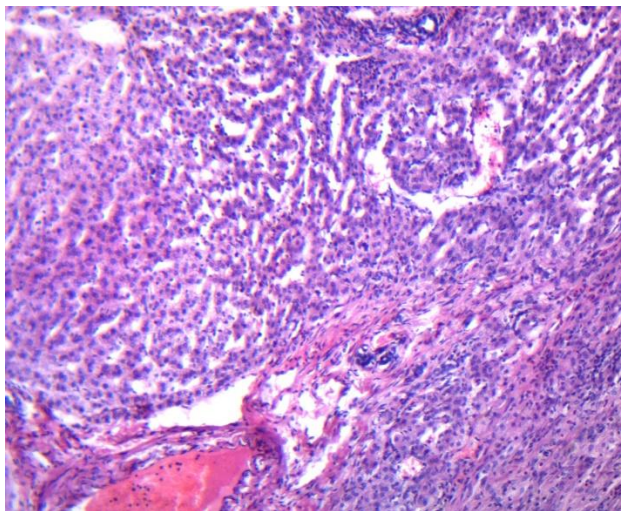


А

Б

Рисунок 3.27 – Печінка кролів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachosomb, Б – хітозанової губки.

У черевній порожнині тварин обох груп був злуковий процес, що обмежував травмовану частку печінки з гемостатичним матеріалом. У однієї тварини був сформований пухкий інфільтрат з чепця та петель тонкої кишки довкола імплантату. Ознак кровотечі чи змін запального характеру не виявлено.



А

Б

Рисунок 3.28 – Печінка кролів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachosomb, Б – хітозанової губки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб x 100:

Гістологічне дослідження зразків із застосуванням хітозанових губок показало виражену лімфоцитарну інфільтрацію зі значною кількістю макрофагів довкола імплантату. У більшості зразків безпосередньо прилегла частина паренхіми була некротизована. Поза нею формувалась грануляційна тканина, що частково відмежовувала гемостатичний матеріал та некротичну тканину. У печінці кролів з мембраною Tachosomb була менша кількість

макрофагів та менш виражена лімфоцитарна інфільтрація. А також дещо менша кількість грануляційної тканини. Хітозанові губки спричиняли незначну біліарну гіпертензію у протоковій системі частки, чого не спостерігали при застосуванні мембрани Tachosorb.

ВИСНОВКИ

1. Губки ацетату хітозану з транексамовою кислотою мали найбільш пористу структуру, показали здатність аглютинувати еритроцити, активувати тромбоцити та адгезувати на своїй поверхні фібробласти.
2. Час зупинки кровотечі при застосуванні хітозанових губок у всіх спостереженнях експерименту на лабораторних тваринах був рівний мембранам «Tachosorb».
3. Застосування губок на основі хітозану призводило до формування злукового процесу у місці пошкодження печінки. Біоматеріал поступово піддавався макрофагальній резорбції та розвитку грануляційної тканини довкола нього.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

- 1 F. Coccolini *et al.*, «WSES classification and guidelines for liver trauma», *World J. Emerg. Surg.*, vol 11, no 1, pp 1–8, 2016.
- 2 H. Tranchart *et al.*, «Bleeding control during laparoscopic liver resection: A review of literature», *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.*, vol 22, no 5, pp 371–378, 2015.
- 3 C. Letoublon *et al.*, «Management of blunt hepatic trauma», *J. Visc. Surg.*, vol 153, no 4, pp 33–43, 2016.
- 4 H. Jiang i J. Wang, «Emergency strategies and trends in the management of liver trauma», *Front. Med. China*, vol 6, no 3, pp 225–233, 2012.
- 5 B. C. Lin, J. F. Fang, R. J. Chen, Y. C. Wong, i Y. P. Hsu, «Surgical management and outcome of blunt major liver injuries: Experience of damage control laparotomy with perihepatic packing in one trauma centre», *Injury*, vol 45, no 1, pp 122–127, 2014.
- 6 G. Tinkoff *et al.*, «American Association for the Surgery of Trauma Organ Injury Scale I: Spleen, Liver, and Kidney, Validation Based on the National Trauma Data Bank», *J. Am. Coll. Surg.*, vol 207, no 5, pp 646–655, 2008.
- 7 Г. Ц. Дамбаев *et al.*, «Интраоперационные способы гемостаза при операциях на печени», Бюллетень сибирской медицины № 4, с 89–93, 2011.
- 8 С.А. Асланян «Методи місцевого гемостазу при пошкодженнях паренхімних органів живота (огляд літераткри)», Літопис травматології та ортопедії , vol № 1-2, (29-30), pp 124-128, 2014.
- 9 S. S. Kumar, «Biopolymers in Medical Applications», *Tech. Text.*, pp 1–15, ISBN 9781498744966.
- 10 C. Paper, « Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review », *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol-9(9), pp 21-25, 2015.
- 11 T. Peng, «Biomaterials for hemorrhage control», *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol 24, no 1, pp 27–68, 2010.
- 12 C. Letoublon *et al.*, «Management of blunt hepatic trauma», *J. Visc. Surg.*, vol

- 153, no 4, pp 33–43, 2016.
- 13 P. Kilen *et al.*, «General surgeon management of complex hepatopancreatobiliary trauma at a level I trauma center», *J. Surg. Res.*, vol 217, pp 226–231, 2017.
 - 14 B.-C. Lin, J.-F. Fang, R.-J. Chen, Y.-C. Wong, i Y.-P. Hsu, «Surgical management and outcome of blunt major liver injuries: experience of damage control laparotomy with perihepatic packing in one trauma centre.», *Injury*, vol 45, no 1, pp 122–7, 2014.
 - 15 S. Nouri, M. R. Sharif, H. Afzali, A. Sharif, i M. Satkin, «The advantages and disadvantages of methods used to control liver bleeding: A review», *Trauma Mon.*, vol 20, no 4, 2015.
 - 16 J. G. Martin, J. Shah, C. Robinson, i S. Dariushnia, «Evaluation and Management of Blunt Solid Organ Trauma», *Tech. Vasc. Interv. Radiol.*, vol 20, no 4, pp 230–236, 2017.
 - 17 S. R. Z. Abdel-Misih i M. Bloomston, «Liver Anatomy», *Surg. Clin. North Am.*, vol 90, no 4, pp 643–653, 2010.
 - 18 A. Al-Hassani, G. Jabbour, M. Ellabib, A. Kanbar, A. El-Menyar, i H. Al-Thani, «Delayed bile leak in a patient with grade IV blunt liver trauma: A case report and review of the literature», *Int. J. Surg. Case Rep.*, vol 14, pp 156–159, 2015.
 - 19 В . Н . Бордаков , М . В . Доронин , Д . С . Савицкий , М . П . Василевский, "Сравнительная характеристика методов местного гемостаза при кровотечении из печени в эксперимент", *Медицинский журанл*, vol 3 (29), pp 30–34, 2009.
 - 20 M. Stellingwerff, A. Brandsma, Amarins, T. Lisman, at alm., "Prohemostatic interventions in liver surgery", *Seminars in Thrombosis and Hemostasis Vol.* 38, No. 3, pp 244-249, 2012 .
 - 21 Г. Е. Миловидова, «Особливості морфологічних змін магістральних судин і тканини печінки при елекровпливі», *Харківська хірургічна школа* vol 6 (44), pp 102–104.

- 22 В.Г. Пахлеванян, С.А. Колесников, «Электрокоагуляционный гемостаз, преимущества и недостатки», Научные ведомости, Серия Медицина. Фармация, vol 5, no 226, pp 5–9, 2016.
- 23 С.М. Ахмедов, Ф.К. Рахими, С.Ш. Ахмедов, Х.Х. Муминов, Ф.Р. Одинаев, Дж. Рашидов, Б.Дж. Сафаров, З.В. Табаров, Дж.Б. Сафаров, «Применение сверхнизких температур в хирургии печени», Доклады Академии наук Республики Таджикистан, vol 56, no 11–12, pp 524–533, 2016.
- 24 Е. В. Пчелинцева, О. И. Уразова, И. А. Лызко, Б. И. Альперович, Н. В. Мерзликин, i А. Н. Байков, «Состояние коагуляционного гемостаза после резекции печени с применением сверхнизких температур в зависимости от функционального состояния органа», Бюллетень сибирской медицины, vol 14, no 2, pp 35–42, 2015.
- 25 В.В. Александров, С.С. Маскин, Л.А. Иголкина, Н.К. Ермолаева, «Перспективы использования локального криогемостаза при травмах печени и селезенки», Кубанский научный медицинский вестник, vol 7, no 142, pp 45–51, 2013.
- 26 М.Ф. Заривчацкий *и др.*, «Профилактика и компенсация кровопотери в резекционной хирургии печени», Пермский медицинский журнал, vol 30, no 5, pp 6–12, 2013.
- 27 А. В. Воробей *и др.*, «Использование высокоэнергетического лазера в гепатопанкреатобилиарной хирургии», *Украинский журнал хирургии*, vol 3, no 22, pp 63–69, 2013.
- 28 G. L. Piper i A. B. Peitzman, «Current Management of Hepatic Trauma», *Surg. Clin. North Am.*, vol 90, no 4, pp 775–785, 2010.
- 29 T. Kobayashi *et al.*, «Staged laparotomies based on the damage control principle to treat hemodynamically unstable grade IV blunt hepatic injury in an eight-year-old girl», *Surg. Case Reports*, vol 2, no 1, p 134, 2016.
- 30 R. Lochan, I. Ansari, R. Coates, S. M. Robinson, i S. A. White, «Methods of haemostasis during liver resection - A UK national survey», *Dig. Surg.*, vol

- 30, no 4–6, pp 375–382, 2014.
- 31 J. G. Clay, D. Zierold, K. Grayson, i F. D. Battistella, «Dextran Polymer Hemostatic Dressing Improves Survival in Liver Injury Model», *J. Surg. Res.*, vol 155, no 1, pp 89–93, 2009.
- 32 M. Emilia *et al.*, «Topical hemostatic agents in surgical practice», *Transfus. Apher. Sci.*, vol 45, no 3, pp 305–311, 2011.
- 33 E. M. Hanna, J. B. Martinie, R. Z. Swan, i D. A. Iannitti, «Fibrin sealants and topical agents in hepatobiliary and pancreatic surgery: a critical appraisal», *Langenbeck's Arch. Surg.*, vol 399, no 7, pp 825–835, 2014.
- 34 C. Zentai *et al.*, «Fibrin patch in a pig model with blunt liver injury under severe hypothermia», *J. Surg. Res.*, vol 187, no 2, pp 616–624, 2014.
- 35 O. Grottke *et al.*, «Effect of TachoSil in a coagulopathic pig model with blunt liver injuries», *J. Surg. Res.*, vol 171, no 1, pp 234–239, 2011.
- 36 K. A. Simo, E. M. Hanna, D. K. Imagawa, i D. A. Iannitti, «Hemostatic Agents in Hepatobiliary and Pancreas Surgery: A Review of the Literature and Critical Evaluation of a Novel Carrier-Bound Fibrin Sealant (TachoSil)», *ISRN Surg.*, vol 2012, pp 1–12, 2012.
- 37 D. Erdogan i T. M. Van Gulik, «Evolution of fibrinogen-coated collagen patch for use as a topical hemostatic agent», *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol 85, no 1, pp 272–278, 2008.
- 38 C. Moench, W. O. Bechstein, V. Hermanutz, G. Hoexter, i H. P. Knaebel, «Comparison of the collagen haemostat Sangustop® versus a carrier-bound fibrin sealant during liver resection; ESSCALIVER-Study», *Trials*, vol 11, no 1, p 109, 2010.
- 39 N. Mayet *et al.*, «A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems», *J. Pharm. Sci.*, vol 103, no 8, pp 2211–2230, 2014.
- 40 X. Xie *et al.*, «A novel hemostatic sealant composed of gelatin, transglutaminase and thrombin effectively controls liver trauma-induced bleeding in dogs», *Acta Pharmacol. Sin.*, vol 34, no 7, pp 983–988, 2013.
- 41 K. M. Lewis *et al.*, «Comparison of two gelatin and thrombin combination

- hemostats in a porcine liver abrasion model», *J. Investig. Surg.*, vol 26, no 3, pp 141–148, 2013.
- 42 R. W. Hutchinson, K. George, D. Johns, L. Craven, G. Zhang, i P. Shnoda, «Hemostatic efficacy and tissue reaction of oxidized regenerated cellulose hemostats», *Cellulose*, vol 20, no 1, pp 537–545, 2013.
- 43 Y. Wu *et al.*, «Oxidized regenerated cellulose-based hemostat with microscopically gradient structure», *Carbohydr. Polym.*, vol 88, no 3, pp 1023–1032, 2012.
- 44 S. Ikram i J. M. Islamia, «Chitosan & Its Derivatives: a Review in Recent Innovations», *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol 6, no 1, pp 14–30, 2015.
- 45 E. S. de Alvarenga, «Characterization and Properties of Chitosan», *Biotechnol. Biopolym.*, 2011.
- 46 V. K. Chandur, a M. Badiger, i K. R. S. S. Rao, «Characterizing Formulations Containing Derivatized Chitosan With Polymer Blending», *Analysis*, vol 1, no 4, pp 950–967, 2011.
- 47 S. Ahmed, M. Ahmad, i S. Ikram, «Chitosan: A Natural Antimicrobial Agent- A Review», no March, 2014.
- 48 D. H. Ngo *et al.*, «Biological effects of chitosan and its derivatives», *Food Hydrocoll.*, vol 51, pp 200–216, 2015.
- 49 R. Rosenthal *et al.*, «The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier», *Biomaterials*, vol 33, no 9, pp 2791–2800, 2012.
- 50 X. Zuo, «Preparation and Evaluation of Novel Thiourea / Chitosan Composite Beads for Copper (II) Removal in Aqueous Solutions», *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol 53, no 11, pp 1249–1255, 2014.
- 51 S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, H. Brancal, P. Coutinho, i I. J. Correia, «Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration», *Carbohydr. Polym.*, vol 111, pp 366–373, 2014.
- 52 M. Pogorielov *et al.*, «Haemostatic chitosan coated gauze: In vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness», *Biomater. Res.*, vol 19, no 1, pp

- 1–10, 2015.
- 53 W. Suginta, P. Sirimontree, N. Sritho, T. Ohnuma, i T. Fukamizo, «The chitin-binding domain of a GH-18 chitinase from *Vibrio harveyi* is crucial for chitin-chitinase interactions», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol 93, pp 1111–1117, 2016.
- 54 L. Huang, B. Zhou, H. Wu, L. Zheng, i J. Zhao, «Effect of apatite formation of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) on osteoblastogenesis using simulated body fluid (SBF) with or without bovine serum albumin (BSA)», *Mater. Sci. Eng. C*, vol 70, pp 955–961, 2017.
- 55 Г. М. Чижиков и др., «Экспериментальное изучение новых средств местного гемостаза в хирургии печени и селезенки», Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье", № 1, сс 19–25, 2011.
- 56 C. Georgiou, K. Neofytou, i D. Demetriades, «Local and systemic hemostatics as an adjunct to control bleeding in trauma», *Am. Surg.*, vol 79, no 2, pp 180–187, 2013.
- 57 E. Aysan, H. Bektas, F. Ersoz, S. Sari, A. Kaygusuz, i G. E. Huq, «Ability of the ankaferd blood stopper to prevent parenchymal bleeding in an experimental hepatic trauma model», *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol 3, no 3, pp 186–191, 2010.
- 58 C. Muanprasat i V. Chatsudthipong, «Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications», *Pharmacol. Ther.*, vol 170, pp 80–97, 2017.