

© Коллектив авторов, 2025

УДК 612.115.3

Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А.

Коагулянтные эффекты композитов хитозана с аминокислотами (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистеин) *in vitro*

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д.1/12

Введение. Одной из проблем современной медицины и физиологии является нормализация процессов свертывания крови в организме как здорового индивидуума, так и больного, особенно в условиях гипокоагуляции. Известен полисахарид хитозан, обладающий кровоостанавливающими свойствами, сочетающимися с антиоксидантными, ранозаживляющими и др. **Цель** – получить наиболее эффективное по коагулянтным свойствам соединение хитозана с аминокислотами и изучить его влияние на систему гемостаза в условиях *in vitro*.

Методика. В исследованиях *in vitro* изучены коагулянтные свойства трех новых композитов (соединений) хитозана (ХТЗ) с аминокислотами – аспарагиновой кислотой (АК), глутаминовой кислотой (ГК), цистеином (Ц). Использованы коагулологические методы, включающие изучение первичного (тест агрегации тромбоцитов) и вторичного (тесты активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ, тромбинового времени – ТВ и протромбинового времени – ПВ) гемостаза. Забор крови у животных (крыс) производили с использованием золетил-ксилазинового наркоза (золетил 15 мг/кг, ксилазин – 8 мг/кг массы тела, в/м).

Результаты. Выявлено, что все соединения в той или иной степени проявили гемостатическое действие относительно контроля с физиологическим раствором. Активация процессов агрегации тромбоцитов максимально превышала значения в контрольной группе на 13, 16 и 25% под влиянием соединений ХТЗ-АК, ХТЗ-ГК и ХТЗ-Ц соответственно. Обнаружено, что эти композиты также в значительной степени усиливали и плазменный гемостаз. Так, ХТЗ-Ц максимально снижал тромбиновое время (ТВ) – на 32%, протромбиновое время (ПВ) – на 10% по сравнению с контролем. Композит ХТЗ-АК подавлял активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) на 14%, ПВ – на 19%, в то время как композит ХТЗ-ГК укорачивал ПВ на 25% относительно контроля.

Заключение. Наилучшим коагулянтом по влиянию на первичный гемостаз установлен композит ХТЗ-Ц, на плазменный гемостаз – ХТЗ-ГК (по влиянию на внешний путь свертывания), ХТЗ-АК (по влиянию на внутренний путь свертывания) и ХТЗ-Ц (по влиянию на общий путь свертывания крови).

Ключевые слова: коагулянты; хитозан; композиты; аспарагиновая кислота; глутаминовая кислота; цистеин; агрегация тромбоцитов; плазменный гемостаз

Для цитирования: Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А. Коагулянтные эффекты композитов хитозана с аминокислотами (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистеин) *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 65–72.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.65-72

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Ляпина Л.А.; редактирование – Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю.; определение параметров крови – все авторы. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Ляпина Людмила Анисимовна, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2025

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E., Shubina T.A.

Coagulant effects of chitosan composites with amino acids (aspartic acid, glutamic acid, cysteine) *in vitro*

Lomonosov Moscow State University, 1/12 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. One of the problems of modern medicine and physiology is the normalization of blood clotting processes in both healthy individuals and patients, especially in the conditions of hypocoagulation. The polysaccharide chitosan is known for its combination of hemostatic, antioxidant, wound healing, etc., properties. **The aim** was to obtain the most effective compound of chitosan (CHTZ) with amino acids in terms of the coagulant properties and to study its effect on the hemostasis system *in vitro*.

Methods. The coagulant properties of three new composites (compounds) of CHTZ with the amino acids, aspartic acid (AA), glutamic acid (GA), and cysteine (C), were studied in *in vitro* experiments. The coagulation study methods included the tests for primary hemostasis (platelet aggregation test) and secondary hemostasis (activated partial thromboplastin time, APTT; thrombin time, TT; and prothrombin time, PT). Blood samples were withdrawn from rats under zoletyl-xylazine anesthesia (zoletyl 15 mg/kg, xylazine 8 mg/kg body weight, *i.m.*).

Results. All the studied compounds produced a hemostatic effect as compared to the control saline. The values of activated platelet aggregation exceeded the values in the control group maximally by 13, 16 and 25% under the action of the compounds CHTZ-AA, CHTZ-GA and CHTZ-C, respectively. These composites also significantly enhanced plasma hemostasis. Thus, CHTZ-C maximally reduced the TT by 32% and the PT by 10% vs. control. The CHTZ-AA composite suppressed the APTT by 14% and the PT by 19%, while the CHTZ-GA composite shortened the PT by 25% relative to the control.

Conclusion. The CHTZ-C composite was the best coagulant by the effect on primary hemostasis; the best effects on plasma hemostasis were noted for CHTZ-GA by the effect on the external coagulation pathway, CHTZ-AA by the effect on the internal coagulation pathway, and CTZ-C by the effect on the general blood coagulation pathway.

Keywords: coagulants; chitosan; composites; aspartic acid; glutamic acid; cysteine; platelet aggregation; plasma hemostasis

For citation: Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E., Shubina T.A. Coagulant effects of chitosan composites with amino acids (aspartic acid, glutamic acid, cysteine) *in vitro*. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 65–72. (In Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.65-72

Author's contribution: concept and design of the study, writing the text – Lyapina L.A.; editing the text – Grigorieva M.E., Obergan T.Yu.; determination of blood parameters – all authors. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: **Ludmila A. Lyapina**, doctor of biol. Scien., prof., Head scientific research M.V. Lomonosov State University, e-mail: lyapinal@mail.ru

Information about the authors:Lyapina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>Obergan T.Y., <https://orcid.org/0000-0002-3760-3943>Grigorieva M.E., <https://orcid.org/0000-0003-0469-3943>Shubina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-1092-8382>

Financing. The research was carried out as a part of a scientific project of the state assignment of the Lomonosov Moscow State University.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.01.2025

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Природный фармакологический препарат полисахарида хитозана обладает гемостатическими свойствами, сочетающимися с антимикробной активностью. Хитозан влияет на первичный (возрастание агрегации тромбоцитов) [1] и плазменный гемостаз (ускорение протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ). Он ингибирует рост бактерий до 8 дней после операции, обеспечивая подходящую среду для полезной микрофлоры

[2] и активно применяется для заживления ран благодаря своим универсальным свойствам, а именно нетоксичности, биосовместимости, биоразлагаемости, легкой перерабатываемости в различные формы (гели, пены, мембраны и шарики) и способности доставки лекарств/генов к месту назначения [3, 4]. Присутствие активных первичных аминов в структуре хитозана позволяет производить дериватизацию с использованием различных функциональных групп и, таким образом, улучшать и расширять его свойства, такие как растворимость и мукоадгезивность, что требуется для биоме-

дицинского применения. Такие производные могут использоваться с хорошими результатами в ряде областей биомедицины, включая усиление трансфекции нуклеиновых кислот в генной терапии, а также способствующих тканевой инженерии [5]. Изучено влияние хитозана на структуру и функцию свертывающих белков, в то же время в некоторых исследованиях не выявлено его значительного воздействия на АЧТВ. При этом параметры тромбоэластограммы под влиянием хитозана демонстрируют изменение процесса свертывания крови в сторону гиперкоагуляции, а полученные результаты дают важное представление о молекулярной основе биологического ответа организма на хитозан [6].

Олигосахарид хитозана (COS) известен своей уникальной биологической активностью: антиоксидантной, противоопухолевой, противовоспалительной, антибактериальной, иммуностимулирующей. Научный интерес к COS определяется возможностью его использования при производстве лекарств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и в тканевой инженерии. По сравнению с соответствующим полимером, COS имеет гораздо более высокие профили абсорбции на кишечном уровне, что обуславливает быстрый доступ к кровотоку и потенциальный контакт с компонентами крови. Он в определенной мере понижает риск гемолиза в зависимости от дозы и молекулярной массы, а необратимая агрегация тромбоцитов наблюдается при его высокой концентрации, что необходимо учитывать в процессе борьбы с кровотечениями [7].

Известно, что кровотечение может произойти как в мирной жизни (дома или во время операции), так, что более вероятно, и на поле боя. Для борьбы с чрезмерным кровотечением необходимо разрабатывать новые, высокоэффективные гемостатические средства. С этой целью специалистами различных направлений создаются фармакологические препараты на основе аминокислот, что является общепринятой практикой. Аминокислоты выполняют в организме множество функций из-за особенностей физических и химических характеристик, выражающихся в образовании белков и пептидов, выполнении роли нейромедиаторов, способности адекватной реализации функций макро- и микроэлементов, витаминов, продуктов метаболизма и пр. [8]. Интерес к аминокислотам, включаемым в соединение с хитозаном, вызван тем, что полученные биопродукты могут обладать не только свойствами, присущими хитозану, но и проявлять активности, относящиеся к аминокислотам. Кроме того, стабильность является общей проблемой как для составов с высокой, так и с низкой концентрацией, однако составы с высокой концентрацией дополнительно

усложняются увеличением их вязкости, что приводит к проблемам с их производством и введением. Для обеспечения устойчивости препаратов в организме разрабатчики лекарств обычно используют не только аминокислоты, но и сахара, а также поверхностно-активные вещества [9].

Был получен новый тип биосовместимых коагулянтных средств на основе хитозана посредством использования L-аспарагиновой и L-глутаминовой аминокислот в качестве сшивающих агентов. Подтверждена их высокая пористость (выше 90%) и низкая плотность (менее 0,08 г/см³). Аэрогели, созданные на их основе, были паропроницаемыми, биоразлагаемыми в присутствии лизоцима человека, обладали антиоксидантной активностью. Все образцы обладали превосходными гемостатическими свойствами при контакте с кровью человека благодаря активации тромбоцитов, подтвержденной тестами на свертываемость крови. Эти биоматериалы проявляли и антибактериальные свойства в отношении как золотистого стафилококка, так и кишечной палочки. Показано, что материалы на основе хитозана имеют большой потенциал при применении как в стерильных, так и в загрязненных условиях и не препятствуют эффективному ранозаживлению даже при замедленной коагуляции, хроническом воспалении, бактериальной инфекции и медленной пролиферации клеток [10].

Установлено, что аспарагиновая кислота (polyaspartic acid, PAsA), входящая в состав гемостатического гидрогеля, включающего хитозан, может остановить кровотечение из травматической раны и значительно уменьшить кровопотерю. В целом гидрогели PAsA демонстрируют большой потенциал в биомедицинском применении, особенно в раневых перевязочных материалах и в восстановлении тканей [11]. Аспарагиновая кислота относится к заменимым аминокислотам, синтезируется в организме из аспарагина. Она входит в состав животных и растительных белков, содержится в центральной нервной системе (ЦНС), особенно в головном мозге. АК обладает иммуномодулирующим действием, повышает физическую выносливость, нормализует баланс возбуждения и торможения в ЦНС и выполняет важнейшую роль в различных метаболических реакциях, способствуя трансформации углеводов в глюкозу с последующим созданием запасов гликогена, в результате чего повышается сопротивляемость организма усталости [12].

Относительно другой заменимой аминокислоты — цистеина показан её защитный эффект против липосомной и индуцированной хитозаном цитотоксичности. Результаты экспериментов свидетельствуют, что пре-

параты N-ацетилцистеина способствуют улучшению кровотока и насыщению тканей печени кислородом, повышению уровня защитных ферментов и детоксикации организма [13]. Цистеин синтезируется в организме млекопитающих из серина с участием метионина, АТФ и витамина В6. Он способствует обезвреживанию некоторых токсических веществ, защищает организм от повреждающего действия радиации, служит мощным антиоксидантом как прямого, так и непрямого действия. Цистеин и его производные могут оказывать на иммунитет как прямое, так и косвенное влияние [8]. В ряде экспериментов было показано, что его применение способствует подавлению избыточной продукции таких иммуноглобулинов, как IgE и IgG4 — маркеров аллергических и некоторых инфекционных патологий, снижению адгезии болезнетворных бактерий, подавлению выработки провоспалительных и профибротических цитокинов, а также угнетению образования и разрушению биопленок патогенных бактерий и грибов. Печень и кишечник являются основными потребителями цистеина, поэтому при его недостатке в организме их функции могут нарушаться [13].

В 2024 г. сообщалось о способности карбоксиметилхитозана в соединении с другой аминокислотой (полиглутаминовой кислотой) оказывать сверхбыстрый эффективный гемостаз при перфорации желудка и заживлении ран [14]. Глутаминовая кислота (или соль глутаминовой кислоты — глутамат) является условно незаменимой алифатической (не имеющая в структуре ароматических связей) аминокислотой. Она присутствует в организме в достаточно большом количестве (до 25%) в составе белков и различных химических веществ, а также в несвязанном свободном состоянии. Глутаминовая кислота может быть синтезирована из оксоглутаровой кислоты, образующейся при метаболизме углеводов, и биосинтезирована из ряда аминокислот, включая орнитин и аргинин. В здоровом организме глутаминовая кислота вырабатывается в достаточном количестве, но с возрастом и при наличии различных патологий у человека ее уровень может снижаться [15]. Она способствует клеточному дыханию, играет ключевую роль в производстве энергии митохондриями как в период физической активности организма, так и в период его восстановления, поддерживает и повышает уровень активности ряда ферментов.

Таким образом, создание композитов хитозана с аминокислотами нацелено на повышение его устойчивости в организме и приобретение им многих дополнительных полезных свойств. Однако детальное влияние биопродуктов на основе хитозана и аминокислот на компоненты крови до сих пор остается не-

достаточно ясным.

Цель работы — получить наиболее эффективные по коагулянтным свойствам композиты хитозана с аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, или цистеином и изучить их всестороннее влияние на систему гемостаза, включая первичный и плазменный гемостаз в условиях *in vitro*.

Методика

В работе использован хитозан водорастворимый (сукцинил хитозана), полученный по запатентованной методике из панцирей красноклещевых крабов в соответствии с ТУ 9284-027-11734126-08 (“Биопрогресс”, Россия), аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и цистеин отечественного производства. В опытах *in vitro* готовили композиты, включающие 5000 мкг хитозана (ХТЗ) и 100 мкг аминокислот. Получали три соединения хитозана в соотношении с аминокислотами, равном 50:1 (ХТЗ-аспарагиновая кислота (ХТЗ-АК); ХТЗ-глутаминовая кислота (ХТЗ-ГК); ХТЗ-цистеин (ХТЗ-Ц)), которые инкубировали при 37°C в течение не менее 30 мин.

Эксперименты проведены с соблюдением этических правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006) и подтверждены локальным этическим комитетом от 04.06.2019 (протокол № 2). Использовано 35 крыс-самцов Wistar массой тела 250–280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь — 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26°C, относительная влажность 50–70%), при свободном доступе к воде и стандартному гранулированному комбикорму (использовался стандартный рацион ООО «Лаботоркорм», Россия).

Для исследования параметров гемостаза использовали кровь здоровых животных. Взятие крови производили у животных из яремной вены (*vena jugularis*) с применением в качестве консерванта 3,8%-го цитрата натрия в соотношении 9:1. Забор крови у животных производили с использованием золетил-ксилазинового наркоза (золетил 15 мг/кг, ксилазин — 8 мг/кг массы тела, в/м). Кровь центрифугировали дважды: сначала — в течение 5 мин при 1000 об/мин для получения богатой тромбоцитами плазмы, а затем — в течение 12 мин при 2500 об/мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. Далее в отдельные пробирки собирали пул плазмы для проведения экспериментов *in vitro*.

Исследовали: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); тромбиновое время (ТВ); протромбиновое время (ПВ) в бедной тромбоцитами

плазме крови, согласно стандартным методам. Свертываемость крови изучали по тестам АЧТВ, ТВ и ПВ на анализаторе свертывания крови АСКа 2-02-“Астра” (Россия). При выполнении этих тестов к 0,1 мл пулированной плазмы добавляли по 0,05 мл (255 мкг) каждого из композитов, далее проводили исследование согласно стандартным методикам.

Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови определяли на агрегометре АЛАТ-2 220LA (“Биола”, Россия) по методу Борна с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации 10^{-6} М [16, 17]. АДФ добавляли к 0,3 мл стандартизированной по количеству тромбоцитов пулированной плазмы непосредственно в кювету после 30 с инкубации с 0,05 мл (255 мкг) каждого из композитов при 37°C при непрерывном перемешивании в кювете агрегометра. Все определения по каждому тесту осуществляли не менее трех раз.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Подчинение данных закону нормального распределения проверяли по тесту Шапиро-Уилка, поэтому далее мы использовали ANOVA. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое ($\bar{M}$) и стандартную ошибку среднего (m). Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с последующими апостериорными сравнениями (тест Ньюмена-Кейлса). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Проведенное в условиях *in vitro* исследование влияния трех разных композитов хитозана с аминокислотами показало, что все три препарата обладали эффектом, активирующим свертывание крови.

Так, композит ХТЗ-АК снижал АЧТВ на 14%, ПВ – на 19%, повышал агрегацию тромбоцитов на 13%, в то время как эквивалентная концентрация ХТЗ укорачивала АЧТВ на 9%. ПВ – на 24%, а агрегацию тромбоцитов повышала на 20% (табл. 1).

Итак, на основании проведенных в условиях *in vitro* экспериментов выявлено, что композит, включающий ХТЗ и АК, обладает способностью повышать свертывание крови по тестам АЧТВ и ПВ относительно контрольных значений, что указывает на его активирующее влияние как на внутренний, так и на внешний пути свертывания крови. Один ХТЗ оказывал в основном влияние на внешний путь свертывания крови (достоверное укорочение ПВ) (табл. 1).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что композит ХТЗ-ГК не влиял на внутренний путь свертывания крови (АЧТВ не изменялось), но оказывал влияние на внешний путь свертывания крови (ПВ укорачивалось) и повышал агрегацию тромбоцитов. Таким образом, с уверенностью можно говорить о коагулянтных эффектах композита ХТЗ-ГК относительно контроля.

Из данных табл. 3 следует, что соединение ХТЗ-Ц также проявляет коагулянтные эффекты относительно контрольного уровня. В то же время коагулянтные эффекты этого соединения сопоставимы с коагулянт-

Таблица 1/ Table 1

Изменение показателей прокоагулянтной активности при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан-аспарагиновая кислота или его составных частей ($M \pm m$)

Changes in the indicators of procoagulant activity when the chitosan-aspartic acid composite or its components are added to normal blood plasma ($M \pm m$)

Условия опыта Experience conditions	АЧТВ, % APTT, %	ТВ, % TT, %	ПВ, % PT, %	Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation, %
Композит ХТЗ-АК, группа 1 Composite CHTZ-AA, group 1	$86 \pm 7.0^{**}$	100 ± 0.3	$71 \pm 5.2^{**}$	$113 \pm 5.6^*$
АК, группа 2 AA, group 2	$70 \pm 3.6^{**}$	107 ± 0.5	86 ± 5.9	80 ± 7.0
ХТЗ, группа 3 CHTZ, group 3	91 ± 4.2	94 ± 0.3	$76 \pm 2.7^{**}$	$120 \pm 6.5^*$
Контроль NaCl, группа 4 Control NaCl, group 4	100 ± 5.2	100 ± 0.3	100 ± 2.9	100 ± 5.8

Примечание. Контроль с NaCl принят за 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой 4, значимость различий между группами 4-1,2,3.
Note. The control with NaCl was accepted as 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to group 4, the significance of the differences between groups 4-1,2,3.

Таблица 2/ Table 2

Изменение показателей прокоагулянтной активности и агрегации тромбоцитов при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан-глутаминовая или его составных частей ($M\pm m$)
Changes in indicators of procoagulant activity and platelet aggregation when adding chitosan-glutamine composite or its components to normal blood plasma ($M\pm m$)

Условия опыта Experience conditions	АЧТВ, % APTT, %	ПВ, % PT, %	Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation, %
Композит ХТЗ-ГК, группа 1 Composite CHTZ-GA, group 1	99 ± 0.88	75 ± 1.7**	116 ± 0.03*
ГК, группа 2 GA, group 2	93 ± 1.3	94 ± 2.9	109 ± 0.2
ХТЗ, группа 3 CHTZ, group 3	89 ± 5.0*	72 ± 2.9*	115 ± 5.0*
Контроль NaCl, группа 4 Control NaCl, group 4	100 ± 5.2	100 ± 2.9	100 ± 5.8

Примечание. Контроль с NaCl принят за 100%, * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$ по сравнению с группой 4, значимость различий между группами 4-1,2,3.
Note. The control with NaCl was accepted as 100%, * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$ compared to group 4, the significance of the differences between groups 4-1,2,3.

Таблица 3/ Table 3

Изменение показателей прокоагулянтной активности и агрегации тромбоцитов при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан-цистеин или его составных частей ($M\pm m$)
Changes in indicators of procoagulant activity and platelet aggregation when adding chitosan-cysteine composite or its components to normal blood plasma ($M\pm m$)

Условия опыта Experience conditions	АЧТВ, % APTT, %	ТВ, % TT, %	ПВ, % PT, %	Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation, %
Композит ХТЗ-Ц, группа 1 Composite CHTZ-C, group 1	96 ± 1.5	68 ± 0.21**	90 ± 0.4**	125 ± 4.5*
Цистеин, группа 2 Cysteine, group 2	88 ± 3.2	103 ± 0.56	97 ± 0.1	77 ± 7.2
ХТЗ, группа 3 CHTZ, group 3	80 ± 0.9*	62 ± 0.7**	79 ± 2.7*	120 ± 6.5*
Контроль NaCl, группа 4 Control NaCl, group 4	100 ± 5.2	100 ± 0.3	100 ± 2.9	100 ± 5.8

Примечание. Контроль с NaCl принят за 100%, * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$ по сравнению с группой 4, значимость различий между группами 4-1,2,3.
Note. The control with NaCl was accepted as 100%, * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$ compared to group 4, the significance of the differences between groups 4-1,2,3.

ной активностью одного ХТЗ по влиянию на агрегацию тромбоцитов и на ПВ. Композит ХТЗ-Ц по влиянию на внутренний механизм свертывания крови более эффективен, чем один ХТЗ, так как достоверно снижает ПВ. По влиянию на общий путь свертывания композит ХТЗ-Ц, как и сам ХТЗ в эквивалентной концентрации, обладает высоким коагулянтным эффектом, активируя тромбин (по тесту ТВ).

Обсуждение

Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что при исследовании гемостазиологических

эффектов трех композитов хитозана с аминокислотами установлены их коагулянтные эффекты относительно контроля, относительно же хитозана коагулянтные эффекты всех композитов ХТЗ-АК, ХТЗ-ГК и ХТЗ-Ц были сопоставимы. Механизм гемостатического действия композитов обусловлен не только присутствием в нем коагулянта хитозана, который способствовал повышению агрегации тромбоцитов и влиял на внешний механизм свертывания крови, но и аминокислот. Так, влияние на внутренний механизм свертывания крови установлено для аспарагиновой кислоты и цистеина.

Включение аминокислот в композиты придает им стабильность [9] и возможность проявлять многие другие полезные свойства (иммунные, антиоксидантные, противотоксичные и др.) [13, 18, 19]. До сих пор остро стоит проблема борьбы с массивной кровопотерей, являющейся причиной многочисленной смертности от кровоизлияния. Лечебного воздействия коммерчески доступных биоматериалов может быть недостаточно для борьбы с чрезмерным кровотечением, поэтому продолжается поиск и разработка новых высокоэффективных комплексных гемостатических агентов [10]. Полученные в настоящем исследовании результаты по изучению созданных нами композитов хитозана с аспарагиновой кислотой или хитозана с цистеином показали наличие у них повышенных гемостатических свойств.

По результатам ряда исследований [5, 18] следует, что хитозан усиливает адгезию и агрегацию тромбоцитов: после начального (в течение 5 мин) и длительного (в течение 30 мин) контакта тромбоцитов с хитозаном. Установлено, что хитозан дозозависимо увеличивает агрегацию тромбоцитов, количество внутриклеточного свободного Ca^{2+} и экспрессию комплекса гликопротеина Пб/Ппа тромбоцитов, вследствие чего хитозан можно отнести к эффективным индукторам адгезии и агрегации тромбоцитов. Мы не исключаем, что механизм наилучшего тромбоцитарного эффекта композита хитозана с цистеином подобен вышеописанному и может быть обусловлен как повышением уровня Ca^{2+} , мобилизацией и усилением экспрессии комплекса гликопротеина Пб/Ппа на поверхностях мембран тромбоцитов [20], так и высвобождением факторов роста из активированных тромбоцитов [21]. В настоящее время создаются перспективные композиционные материалы на основе хитозана для применения в качестве гемостатических и ранозаживляющих средств [6, 19].

Впервые в нашей работе проведено комплексное исследование изменений показателей всех звеньев системы гемостаза (сосудисто-тромбоцитарного и плазменного) под влиянием не только хитозана, но и композитов хитозана с аминокислотами. В условиях *in vitro* повышение агрегации тромбоцитов установлено при высоких концентрациях хитозана (5 мг/мл), что относится как отдельно к хитозану, так и к его композитам с аминокислотами. Выявлено также, что параметры плазменного гемостаза изменяются в сторону активации свертывающих факторов крови внешнего пути свертывания под влиянием всех композитов хитозана с аминокислотами, но в наибольшей степени композита с глутаминовой кислотой.

Заключение

Полученные результаты указывают на потенциальные возможности препаратов на основе коагулянта хитозана совместно с аминокислотами (аспарагиновой, глутаминовой или цистеином) влиять на гемостазологический статус организма, особенно в условиях пониженной свертываемости крови с признаками геморрагии. Созданные нами композиты хитозана с аминокислотами обладают комплексным действием на первичный и плазменный гемостаз. Механизм их коагулянтного действия обусловлен в основном влиянием на свертывающие факторы плазменного гемостаза и на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, что свидетельствует об усилении агрегации тромбоцитов. Наилучшим коагулянтом по влиянию на первичный гемостаз установлен композит хитозана с цистеином, на внешний путь свертывания плазменного гемостаза — композит с глутаминовой кислотой, на внутренний путь свертывания — композит с аспарагиновой кислотой и на и общий путь свертывания крови — композит с цистеином. Несомненно, композиты на основе хитозана могут быть отнесены к перспективным средствам для восстановления показателей гемостаза в условиях пониженной свертываемости крови.

Литература

(п.п. 1–7; 9–11; 13; 14; 18; 19; 21 см. References)

8. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. *Аминокислоты, пептиды, белки*. М.: Мир; 1985.
12. Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012; 2: 88–105.
15. Стручкова И.В., Брилкина А.А. *Аминокислоты*. Учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет; 2016.
16. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза*. М.: Ньюдиамед; 2008.
17. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансед солюшнз; 2012.
20. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-издательство; 2010.

References

1. Chou Tz.-C., Fu E., Wu C.-J., Yeh J.-H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302(3): 480–83. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00173-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00173-6)
2. Wang C.H., Cherng J.H., Liu C.C., et al. Procoagulant and Antimicrobial Effects of Chitosan in Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(13): 7067. <https://doi.org/0.3390/ijms22137067>

3. Ilyas R.A., Aisyah H.A., Nordin A.H., et al. Natural-fiber-reinforced chitosan, chitosan blends and their nanocomposites for various advanced applications. *Polymers (Basel)*. 2022; 14(5): 874. <https://doi.org/10.3390/polym14050874>
4. Moeini A., Pedram P., Makvandi P., et al. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* 2020; 233(115839). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
5. Casertari L., Vlasaliu D., Lam J.K.W., et al. Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: a review. *J. Biomaterials*. 2012; 33(30): 7565–83. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.104>
6. Zhang W., Zhong D., Liu Q., et al. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J. Biomater. Sci. Polym.* 2013; 24(13): 1549–63. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.777229>
7. Guo X., Sun T., Zhong R., et al. Effects of Chitosan Oligosaccharides on Human Blood Components. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: 1412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01412>
8. Yakubke H.D., Eshkait H., *Amino acids, peptides, proteins. [Aminokisloty, peptidy, proteiny]*. M.: Mir; 1985. (in Russian)
9. Srivastava Arvind, O'Dell Courtney, Bolessa Evon et al. Viscosity reduction and stability enhancement of monoclonal antibody formulations using derivatives of amino acids. *J Pharm Sci.* 2022; 111(10): 2848–56. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.05.011>
10. Radwan-Pragłowska J., Piątkowski M., Deineka V. et al. Chitosan-Based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties-synthesis and characterization. *Molecules*. 2019; 24(14): 2629. <https://doi.org/10.3390/molecules24142629>
11. Chen D., Liu X., Qi Y. et al. Poly(aspartic acid) based self-healing hydrogel with blood coagulation characteristic for rapid hemostasis and wound healing applications. *Colloids Surf. Biointerfaces*. 2022; 214: 112430. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112430>
12. Lysikov Yu.A. Amino acids in human nutrition. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012; 2: 88–105. (in Russian)
13. Hamedinasab H., Rezayan A.H., Jaafari M.R. et al. The protective effect of N-acetylcysteine against liposome and chitosan-induced cytotoxicity. *J Microencapsul.* 2023; 40(5): 357–365. <https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2209646>
14. Dejian B., Zheng C., Yongliang O., et al. Ultrafast self-gelling, sprayable, and adhesive carboxymethyl chitosan/poly-γ-glutamic acid/oxidized dextran powder for effective gastric perforation hemostasis and wound healing. *J. Biol. Macromol.* 2024; 254(3): 127960. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2023.127960>
15. Struchkova I.V., Brilkina A.A. *Amino acids. Educational and methodical manual. [Aminokisloty. Uchebno-metodicheskoe posobie]*. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University; 2016. (in Russian)
16. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostics and controlled therapy of the hemostasis system. [Diagnostika i kontroliruemaya terapiya sistemy gemostaza]*. M.: Newdamed; 2008. (in Russian)
17. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anti-coagulant blood system. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertyvayushchei sistemy krovi]*. Moscow: Advanced Solutions; 2012. (in Russian)
18. Periyah M.H., Halim A.S., Yaacob N.S., et al. The induction of glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 by oligochitosan accelerates platelet aggregation. *Biomed. Res. Int.* 2014; (653149). <https://doi.org/10.1155/2014/653149>
19. Hu Z., Zhang D.Y., Lu S.T., et al. Chitosan-based composite materials for promising hemostatic applications. *Mar Drugs*. 2018; 16(8): 273. <https://doi.org/10.3390/md16080273>
20. Kuznik B.I. *Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostasis system in norm and pathology. [Kletochnyy i molekulyarnyy mekhanizm sistemy gemostaza v norme i patologii]*. Chita: Express Publishing House; 2010. (in Russian)
21. Shen E.C., Chou T.C., Gau C.H., et al. Release of growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible biomaterial for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin. Oral. Implants. Res.* 2006; 17(5): 572–78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01241.x>

Сведения об авторах:

Ляпина Людмила Анисимовна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: lyapinal@mail.ru;

Оберган Тамара Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: tobergan@mail.ru;

Григорьева Марина Евгеньевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: mgrigorjeva@mail.ru;

Шубина Татьяна Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: shubina-74@mail.ru