

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ

ДЕЙНЕКА ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ

УДК: 616.36-001-005.1-089.4:547.995(043.3)

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ  
БІОМАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ДЛЯ ЗУПИНКИ  
КРОВОТЕЧІ З РАН ПЕЧІНКИ**

14.01.03 – хірургія

Робота на здобуття кваліфікаційного ступеня магістра

**Науковий керівник:**

Кононенко М.Г.

доктор медичних наук, професор  
кафедри хірургії та онкології

Суми – 2018

## ЗМІСТ

|  |    |
|--|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....  | 3  |
| ВСТУП .....  | 4  |
| РОЗДІЛ 1_ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....   | 7  |
| 1.1 Особливості кровотечі при пошкодженні печінки та способи її зупинки. ....                      | 7  |
| 1.2 Застосування хітину та хітозану в медицині.....  | 15 |
| РОЗДІЛ 17_МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....  | 17 |
| 2.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових губок.....             | 17 |
| 2.1.1 Растрова електронна мікроскопія. ....  | 17 |
| 2.1.2 Визначення швидкості деградації губок .....  | 18 |
| 2.1.3 Дослідження сорбційних властивостей.....   | 18 |
| 2.1.4 Дослідження зміни рН.....  | 18 |
| 2.1.5 Визначення виходу транексамової кислоти.....   | 18 |
| 2.2 Дослідження взаємодії губок на основі хітозану з кров'ю.....                                   | 18 |
| 2.2.1 Реакція аглютинації еритроцитів. ....  | 19 |
| 2.2.2 Сорбція крові.....   | 19 |
| 2.2.3 Клінічний аналіз крові та коагулограма.....  | 19 |
| 2.2.4 Визначення цитотоксичності та адгезивності з використанням культур фібробластів. ....        | 20 |
| 2.3 Дослідження місцевого гемостатичного ефекту губок на основі хітозану.....                      | 21 |
| 2.4 Гістологічне дослідження.....  | 22 |
| 2.5 Статистичні методи .....   | 23 |
| РОЗДІЛ 3_РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ .....   | 24 |
| 3.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових хітозанових губок..... | 24 |
| 3.2 Результати дослідження експерименту на лабораторних тваринах.....                              |    |
| РОЗДІЛ 4_АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....                                      | 44 |
| ВИСНОВКИ .....   | 50 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....  | 51 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

FDA – флюоресцеїн діацетат.

PI – пропідіум йодид.

SBF – simulated body fluid.

HGB – гемоглобін.

RBC – еритроцити.

PTL – тромбоцити.

MPV – середній об'єм тромбоцитів.

PDW – ширина розподілу тромбоцитів.

АЧТЧ – активований частковий тромбопластиновий час.

SEM – скануюча електронна мікроскопія.

ДА – децетилювання.

ТК – транексамова кислота.

## ВСТУП

### Актуальність проблеми

Пошкодження печінки при травмі живота зустрічаються в 32,6 % і по частоті займають серед пошкоджень паренхіматозних органів 1 місце [1]. Збереження гемостазу під час хірургічних втручань стає дедалі важливішим у епоху мінімально-інвазивних операцій та зростаючої потреби в зниженні використання продуктів крові [2]. Значна травматизація цього органу пояснюється його анатомічним положенням і особливостями будови: значна питома вага і об'єм, більша поверхня зіткнення з реберної дугою і міцність зв'язкового апарату, що перевершує міцність самого органу [3]. Поранення печінки супроводжуються значною крововтратою, середній обсяг якої становить 2,2 л [4]. Післяопераційна летальність при пошкодженнях досягає 33%; при поєднаних травмах вона підвищується до 60%. Загальна летальність при пораненнях і травмах печінки коливається від 20 до 40%. Незадовільні результати лікування пошкоджень печінки в першу чергу зумовлені відсутністю надійних способів гемостазу [5 - 6].

Для зупинки паренхіматозної кровотечі запропоновані різні способи і методи: здавлення тканин печінки затискачем, кетгутовою сіткою, гепатопексія, використання місцевих гемостатичних матеріалів, накладення гемостатичних швів, електрокоагуляція, вплив лазером, ультразвуком, емболізація, різні фармакологічні засоби і ін [7]

Застосування місцевих гемостатичних матеріалів набуло значної поширеності в хірургії печінки через свою простоту використання, високу ефективність та доступність для всіх рівнів надання хірургічної допомоги. Попри великий асортимент матеріалів біологічного та небіологічного походження цінова політика виробників не дозволяє широко використовувати їх в Україні. Це призводить до пошуку доступніших і не менш ефективних місцевих гемостатичних матеріалів [8].

В останній час збільшилася кількість досліджень щодо можливості застосування в якості місцевого гемостатика хітозан, який є похідним хітинової оболонки ракоподібних. Хітозан має ряд властивостей, що обумовлюють його використання як матеріалу для зупинки кровотечі – відновлюваність ресурсів, відсутність токсичності, апірогенність, гемостатичні та бактеріостатичні властивості, біосумісність та біодеградацію. Також він здатний стимулювати процеси регенерації [9 – 11].

Проте не вирішеними залишаються питання щодо гемостатичного ефекту матеріалів на основі хітозану та перебіг репаративної регенерації печінки при його застосуванні.

**Мета дослідження** – визначення ефективності зупинки паренхіматозної кровотечі з ран печінки при використанні губок на основі хітозану.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Дослідити фізико-хімічні властивості та цитотоксичність хітозанових губок різного складу.
2. Оцінити ефективність зупинки кровотечі на моделі кровотечі з ран печінки лабораторних тварин.
3. Вивчити реакцію паренхіми печінки на застосування біоматеріалу.

**Об'єкт дослідження** – місцевий гемостаз печінки.

**Предмет дослідження** – особливості застосування хітозанових губок при експериментальному моделюванні паренхіматозної кровотечі.

**Методи дослідження:** дослідження фізико-хімічних властивостей (сорбція, деградація, вихід транексамової кислоти, PEM,) та цитотоксичності (культура клітин) хітозанових губок, оцінка швидкості та ефективності гемостазу, гістологічне дослідження, статистичні методи.

## **Наукова новизна роботи**

Розроблено та досліджено різні види губок на основі хітозану. Виявлено, що ацетат хітозану з транексамовою кислотою володіє вираженим гемостатичним ефектом, не має цитотоксичності та не впливає на оточуючі тканини.

## **Практичне значення одержаних результатів**

Виконано експериментальне дослідження гемостатичних властивостей губок хітозану. Представлені матеріали можуть бути використані для подальшого дослідження з метою створення лікарських препаратів – хітозанових гемостатичних губок.

## **Особистий внесок здобувача**

Магістрантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних джерел за темою наукового дослідження, визначено мету та завдання дослідження. Автором розроблено патент на корисну модель – створення місцевих гемостатичних матеріалів та отримано пріоритет на нього, проведено постановку експерименту, забір матеріалу, здійснені аналіз та статистична обробка одержаних результатів, оформлення їх у вигляді графіків і таблиць, сформульовані висновки, підготовлені наукові матеріали до публікацій та виступів на конференціях.

## **Апробація результатів дослідження**

Матеріали магістерської роботи обговорювались на Науково-практичній конференції «Морфологічні дослідження, виклики сучасності» (м. Суми 5-7 жовтня 2016 р.). 8-му Міжнародному студентському медичному конгресі «8th International Student Medical Congress in Košice (Кошице, Словаччина, 22 – 24 червня 2016 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро 5-7 жовтня 2016 р.).

## **Обсяг і структура роботи**

Робота викладена на 57 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел.

## **РОЗДІЛ 1**

### **ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

#### **1.1 Особливості кровотечі при пошкодженні печінки та способи її зупинки.**

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 випромінювання, що генерується різними типами лазерних скальпелів, - CO<sub>2</sub>, 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:**

| <b>Форма матеріалу</b>                     | <b>Тип матеріалу</b> | <b>Приклад</b>   |
|--|----------------------|--|
| 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 альгінат 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-глутамінові кислоти) клей.   |

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

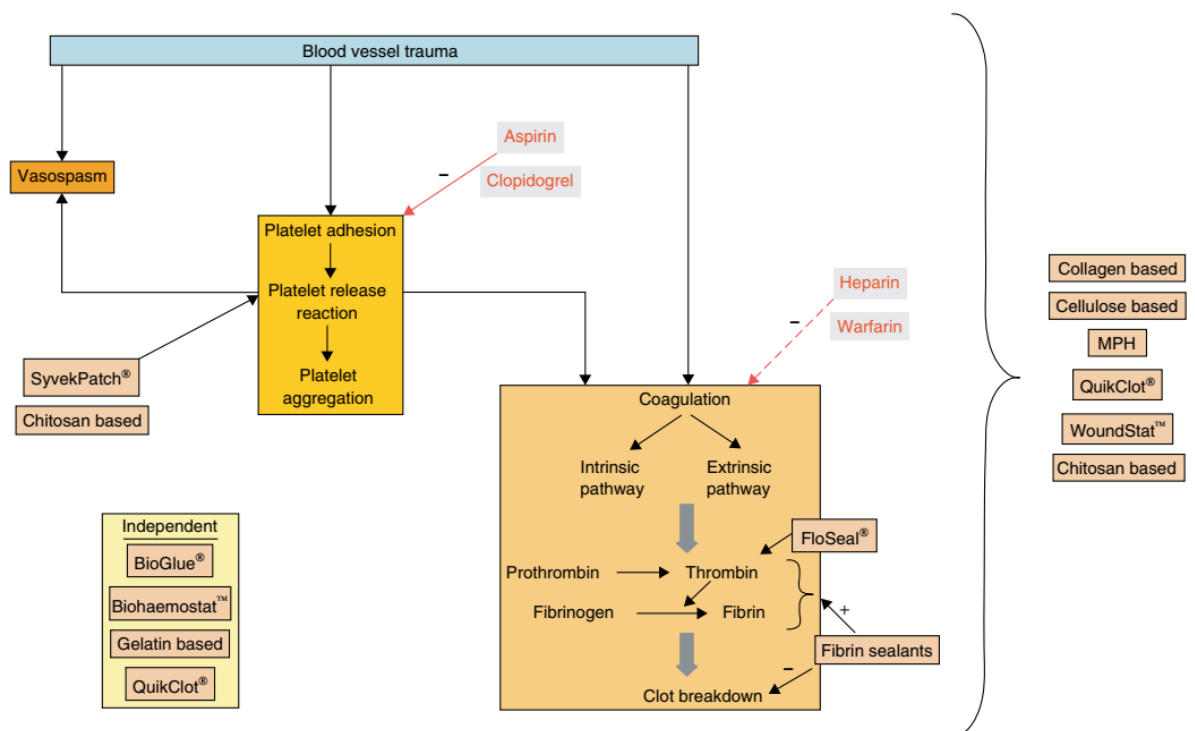


Рис. 1.1 Механізм дії гемостатичних матеріалів. (H. Seyednejad, M. Imani, T. Jamieson and A. M. Seifalian / *Topical hemostatic agents // British Journal of Surgery* 2008; 95: 1197–1225)

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, порошків, чи гелів [32].

Білки фібриногену і тромбіну – два найбільш важливі білки коагуляції. Фібриноген, як великий розчинний білок, присутній в нормальній плазмі. 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/см<sup>2</sup>, і бичачого тромбіну 1,5-2,5 МО/см<sup>2</sup> (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 кровотрати. 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 губчасту структуру. Gelfoam (Upjohn, Kalamazoo, MI, США) – основний продукт на основі желатину. Але поряд з високою вартістю даної продукції, її не можна застосовувати при значній парнхіматозній 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 динітроген 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].

## **1.2 Застосування хітину та хітозану в медицині**

Сучасним направленням в розробці місцевих гемостатичних засобів є матеріали на основі хітозану. Хітозан – сополімер, який складається з  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) -зв'язаних 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкопіранози та 2-аміно-2-дезоксид-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.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### **2.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових губок**

У роботі досліджувались гемостатичні властивості губок на основі хітозану після пошкодження паренхіми печінки у лабораторних тварин. Гемостатичні хітозанові губки були отримані у співпраці з Інститутом прикладної фізики НАН України (м. Суми). 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 заморожували при -25 °С 24 год. і ліофільно висушували у вакуумі (0,1Па) при температурі +20.

##### **2.1.1 Растрова електронна мікроскопія**

Для визначення особливостей поверхні та внутрішньої будови сформованих губок проводили напилення зразків сріблом у стандартній вакуумній установці (ВУП-5) товщиною 40–50 нм. Досліджували зовнішню поверхню мембрани та її профілю на растровому мікроскопі РЕММА-102 (SELMІ, Україна) при збільшенні від 300 до 2 000 разів.

### **2.1.2 Визначення швидкості деградації губок**

Для визначення швидкості деградації губку занурювали у розчин simulated body fluid (SBF) pH = 7,2 за температури 37 °C. 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) pH = 7,2 за температури 37 °C. 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 pH**

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

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 кожну 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 "Флорис" 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 CO<sub>2</sub>-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 флуоресцеїн. 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 місцевого гемостатичного ефекту губок на основі хітозану**

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 уклали 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<sup>®</sup> 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 лапаратомну рану пошарово зашивали вузловими капроновими швами.

Упродовж усього терміну проведення експерименту тварин щодня оглядали, відмічали їх загальний стан, активність, стан лапаратомної 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 депарафінізації 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  $t \leq 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1 Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності хітозанових хітозанових губок

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]. Транексамова кислота, що додається до її структури діє як інгібітор фібрinolізу. У дослідженні ми використовували різні типи губок, з розчинів хітозану в 1 % оцтовій кислоті, 1 % молочній кислоті, 2 % аскорбіновій кислоті, 5 % щавлевої кислоті.

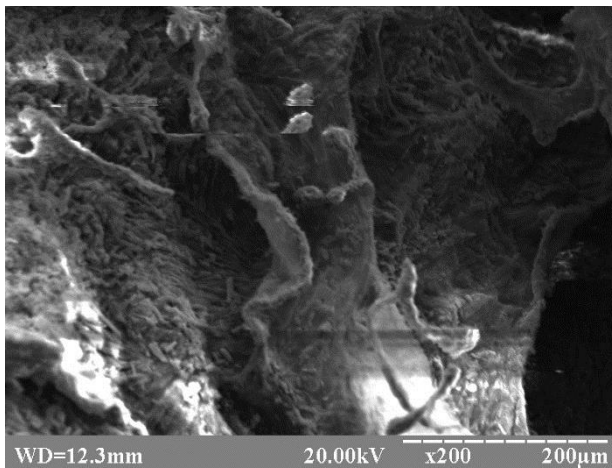
Растрова електронна мікроскопія поверхні матеріалу показала, що губки мають складну топографію, і їх будова залежить від виду органічної кислоти. Так, при розчиненні в молочній кислоті губки мали більш виражений гребінчастий рельєф проте мали меншу пористість у порівнянні з ацетатом та аскорбатом хітозану.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

Сумарний об'єм відкритих пор склав:

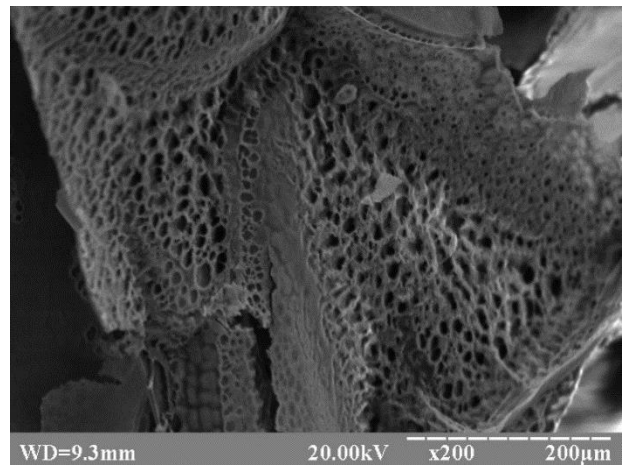
- Ацетат хітозану –  $40 \pm 0,3 \text{ см}^3/\text{г}$ ;
- Лактат хітозану –  $14,3 \pm 0,5 \text{ см}^3/\text{г}$ ;
- Оксалат хітозану –  $20 \pm 0,2 \text{ см}^3/\text{г}$ ;
- Аскорбат хітозану –  $25 \pm 0,3 \text{ см}^3/\text{г}$ .

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

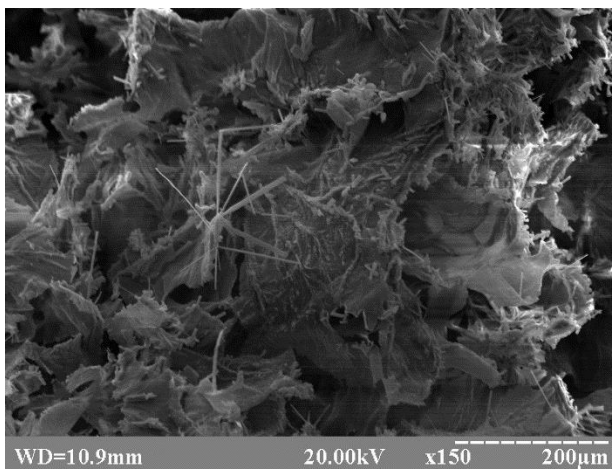




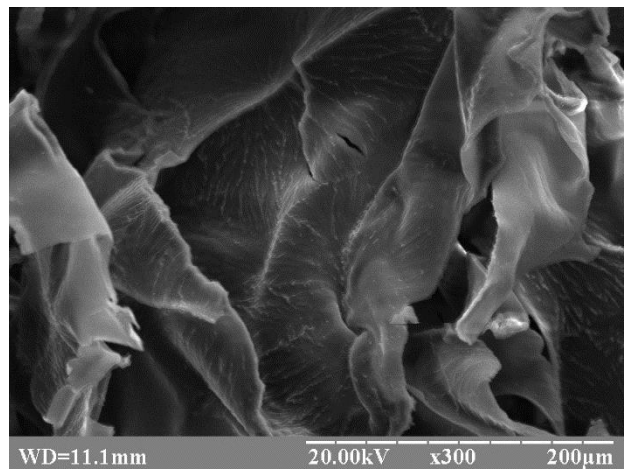
Ацетат хітозану



Аскорбат хітозану



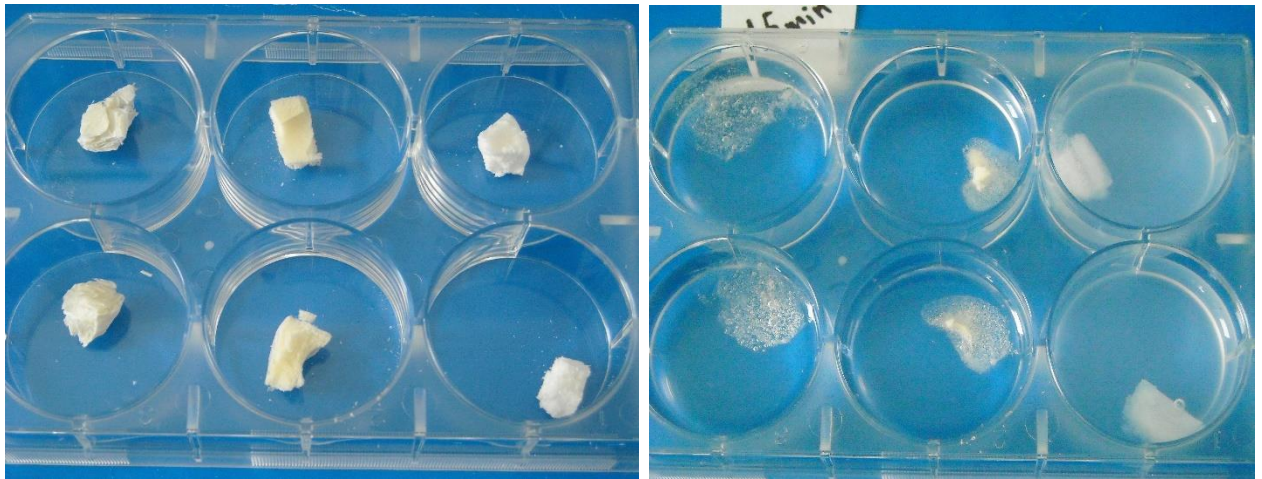
Оксалат хітозану



Лактат хітозану

Рисунок 3.1 – Растрова мікроскопія поверхні губок. Зб. х 200 – 300

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.



А

Б

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].

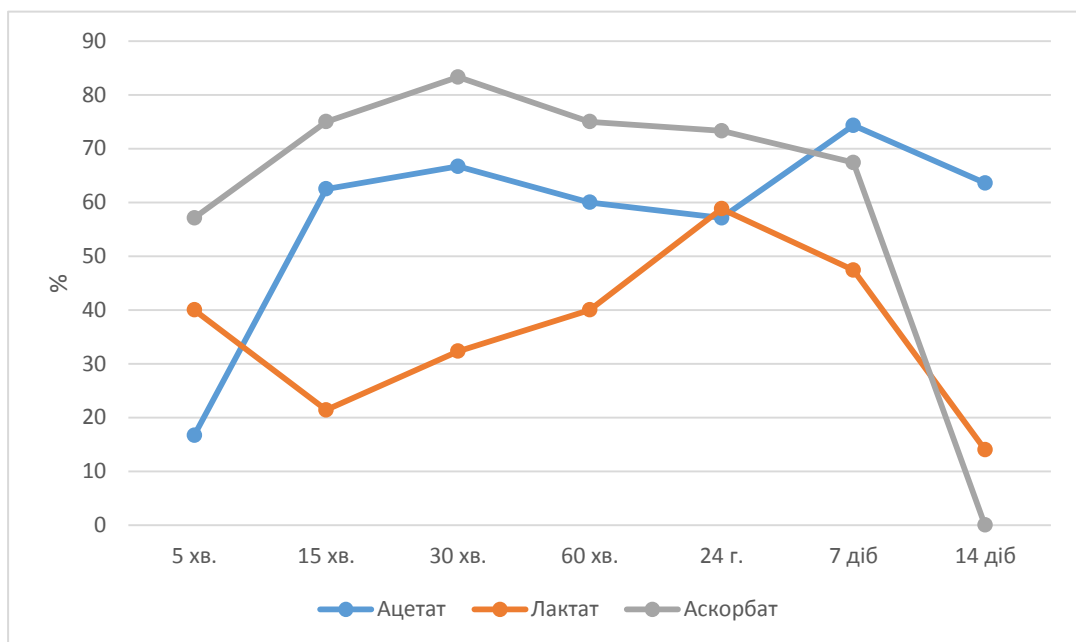


Рисунок 3.3 – Відсоток втрати маси губок в різні терміни після занурення в розчин SBF.

Оксалат хітозану 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. Після цього його деградація стабілізувалася. Губка повністю розчинилась на 14 день дослідження. Лактат хітозану 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. Ацетат хітозану за перші 15 хв. втратив  $62,5 \pm 0,9$  % маси. До кінця 14 діб його маса суттєво не змінилась.

Таку зміну маси частково можна обумовити тим, що за перші 5 хв. зразки ацетату ( $4248 \pm 3,4$  %) та лактату хітозану ( $4424 \pm 4,1$  %) здатні до значного набухання внаслідок своєї гідрофільної структури. Протягом години об'єм води дещо зменшувався. Другий пік припадав на 60 хв. після чого набухання ацетату та лактату хітозану поступово зменшувалося. Аскорбат хітозану збільшився на  $1980 \pm 2,3$  % і протягом 24 годин цей показник суттєво не змінився.

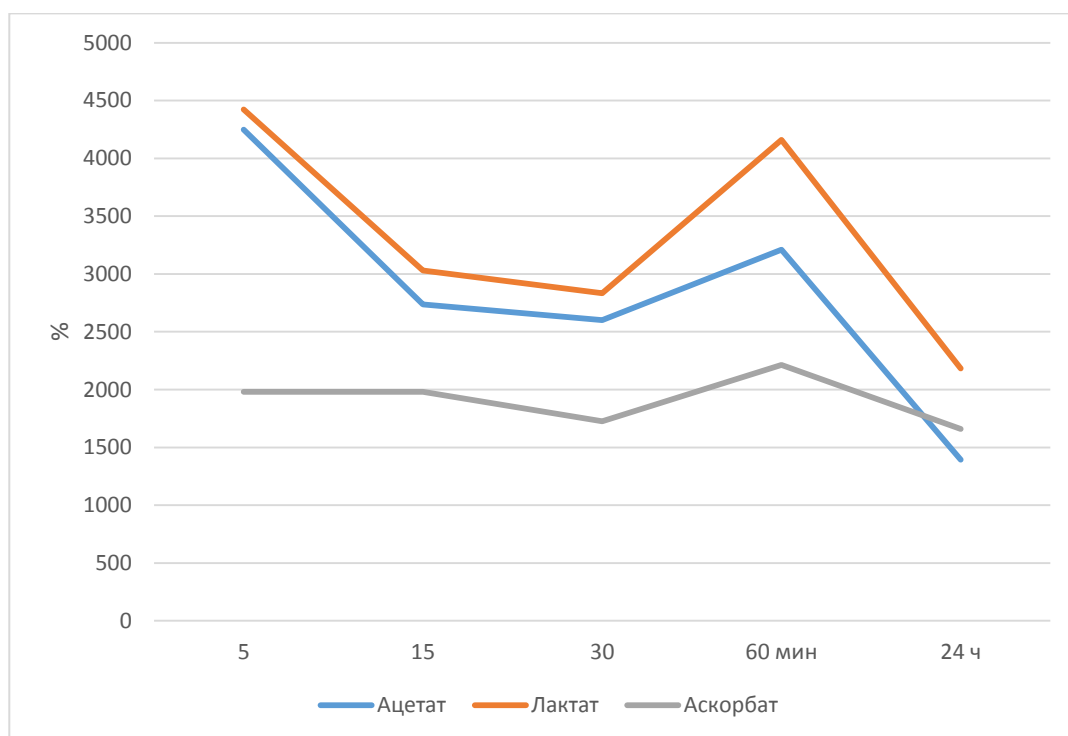


Рисунок 3.4 – Сорбція зразків після занурення в розчин SBF.

Усі три зразки губок показали, що практично не змінюють рН під час своєї деградації, лише оксалат хітозану за рахунок швидкої деградації призвів до зниження рН на 5 хв спостереження до  $3,34 \pm 0,6$ .

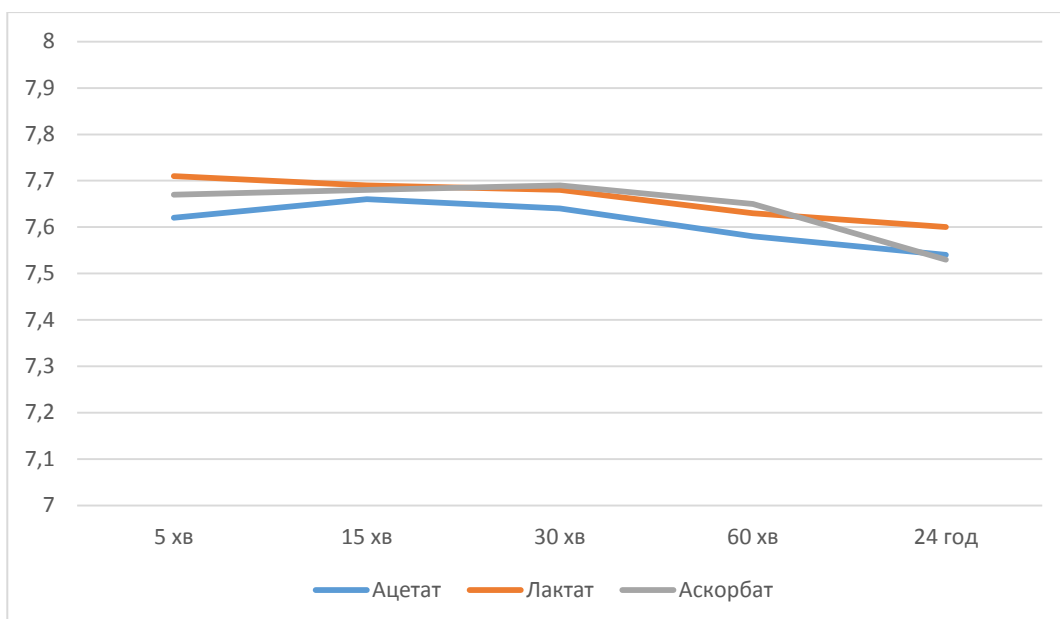


Рисунок 3.5 – Зміни рН після занурення в розчин SBF.

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.

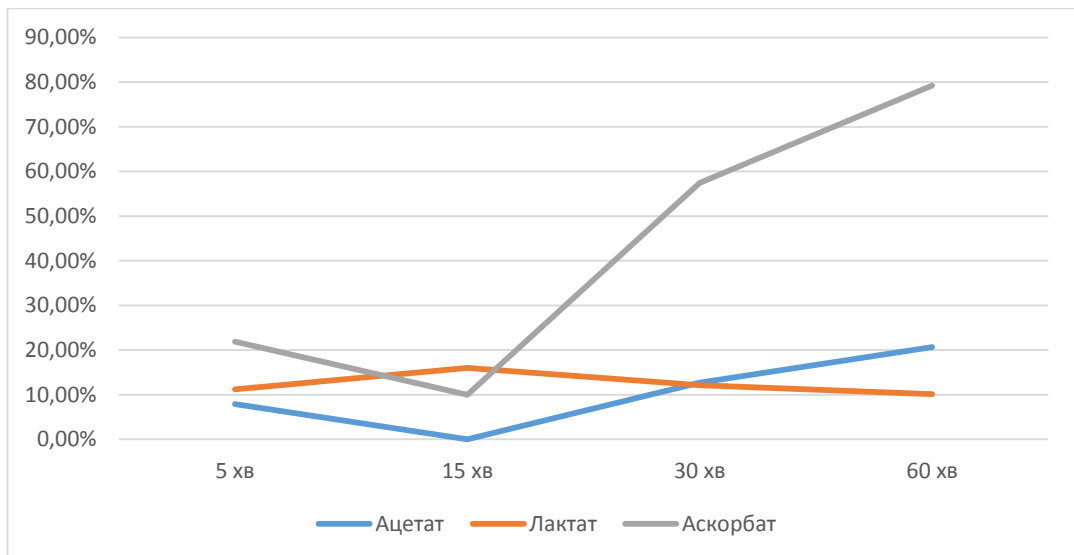


Рисунок 3.6 – Вихід транексамової кислоти після занурення в розчин SBF.

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

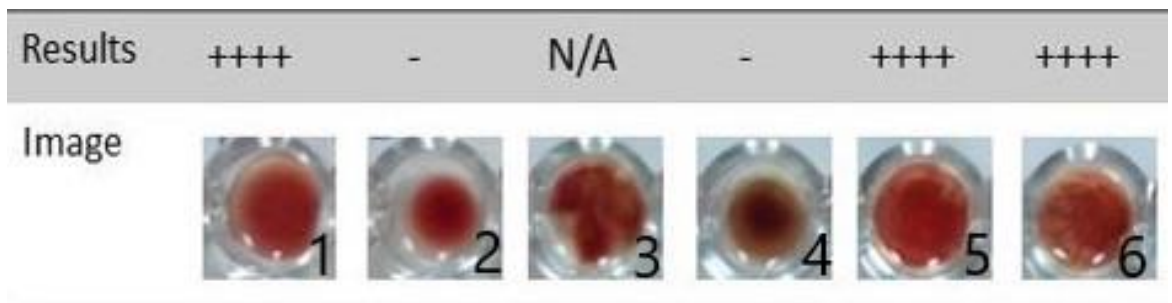


Рисунок 3.7 – Реакція аглютинації еритроцитів. 1 – Позитивний контроль; 2 – Негативний контроль; 3 – Лактат хітозану; 4 – Оксалат хітозану; 5 – Ацетат хітозану; 6 – Аскорбат хітозану.

За результатами реакції аглютинації еритроцитів найбільш ефективними виявились зразки ацетату та аскорбату хітозану, що спричинили аглютинацію рівну позитивному контролю. Гель лактату хітозану мав сумнівний результат тоді як оксалат хітозану взагалі не спричинив аглютинацію еритроцитів.

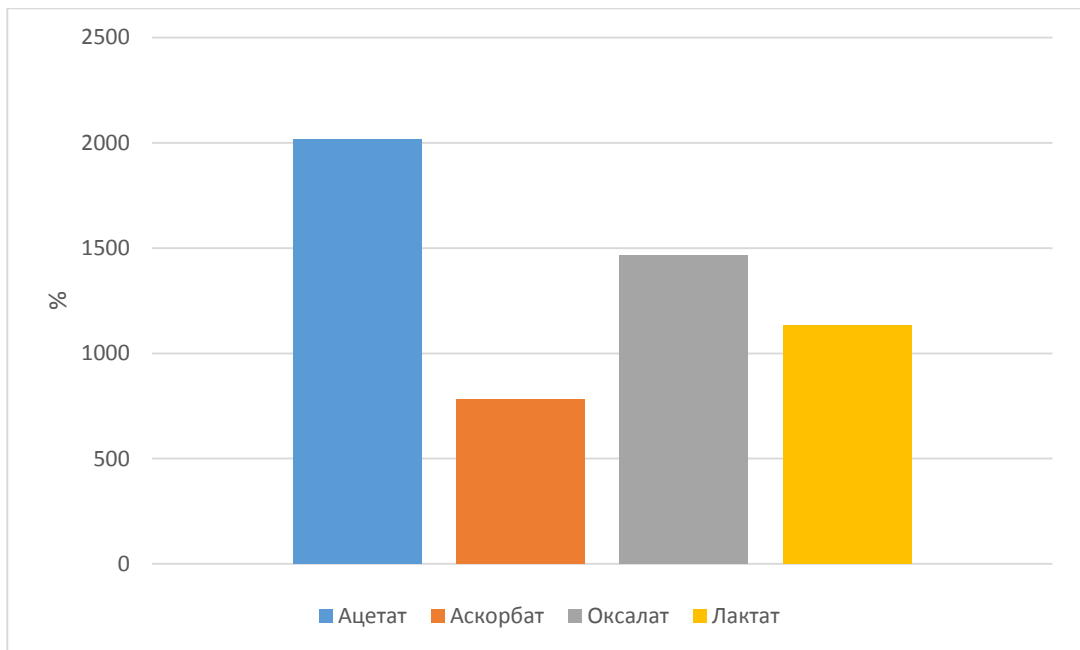


Рисунок 3.8 – Сорбція крові.

При взаємодії губок з кров'ю найбільшу сорбційну властивість показали губки ацетату хітозану, що через 10 хв. взаємодії з кров'ю у вакутайнері збільшили свою масу на  $2016 \pm 2,5$  %. Найменш здатний сорбувати рідку частину крові аскорбат хітозану, що збільшив свою масу лише на  $783 \pm 1,1$  %. Губки оксалату та лактату хітозану показали подібні результати  $1466 \pm 1,7$  % і  $1133 \pm 1,4$  %.

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

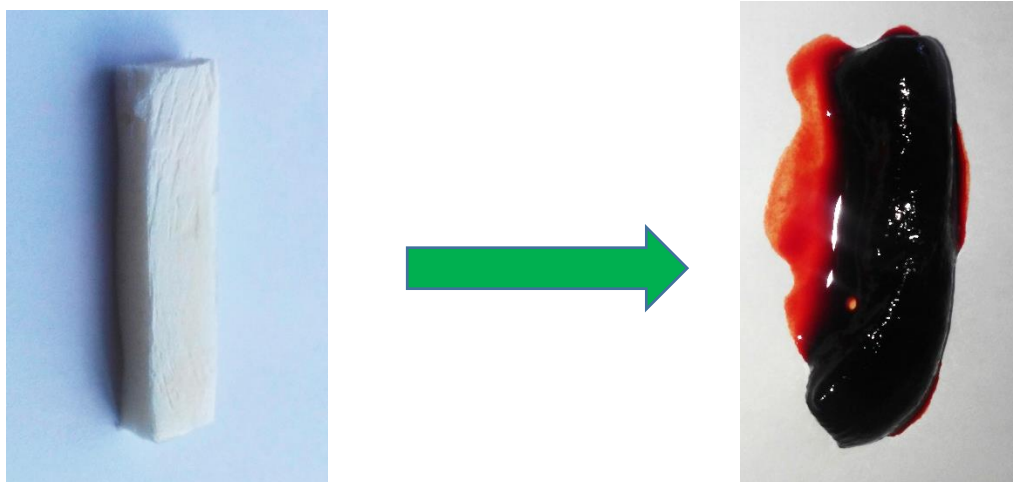


Рисунок 3.9 – Губка ацетату хітозану після взаємодії з кров'ю.

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 ( $p > 0,05$ ).

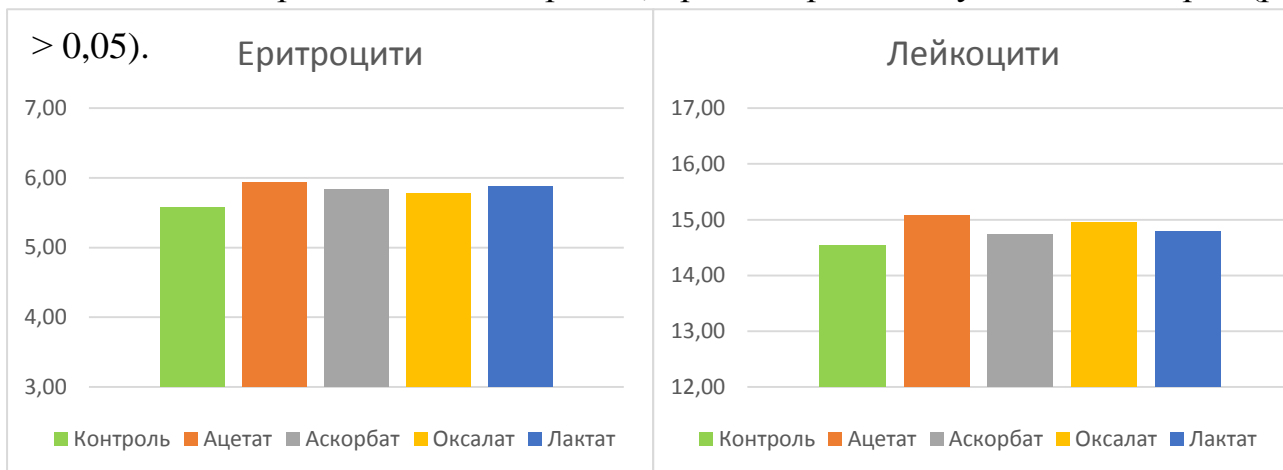


Рисунок 3.10 – Показники еритроцитів та лейкоцитів після взаємодії з кров'ю.

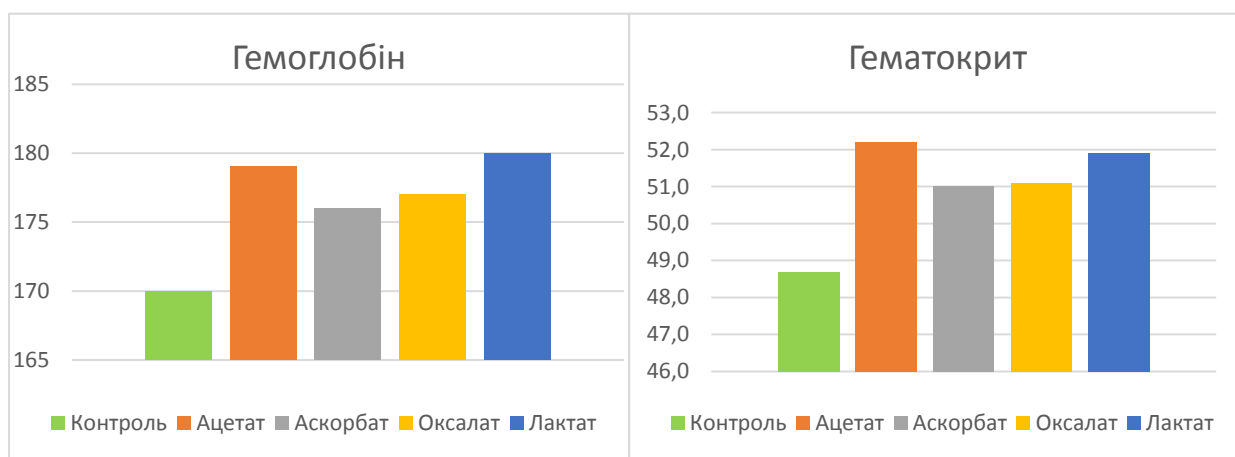


Рисунок 3.11 – Показники гемоглобіну та гематокриту після взаємодії з кров'ю.

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 достовірною ( $p > 0,05$ ).

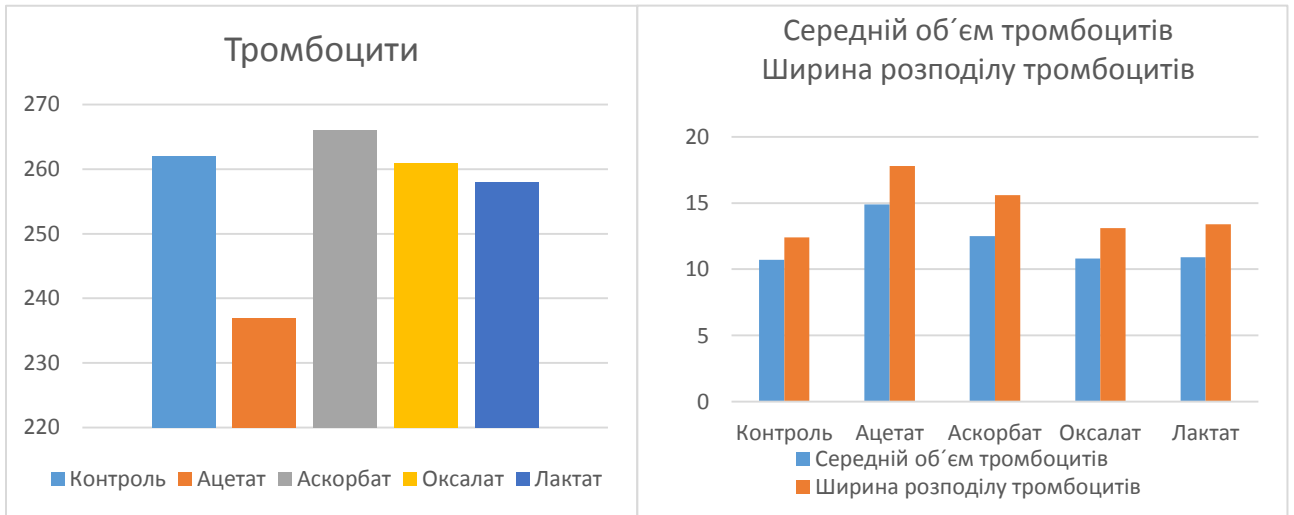


Рисунок 3.12 – Показники тромбоцитів, середнього об'єму тромбоцитів та ширини розподілу тромбоцитів після взаємодії з кров'ю.

Кількість тромбоцитів ( $237 \pm 8$  г/л) була суттєво нижча від контрольного зразка ( $262 \pm 6$  г/л) ( $p < 0,05$ ). Результати аскорбату, оксалату та лактату хітозану не відрізнялись від контролю ( $p > 0,05$ ). Вимірювання середнього об'єму тромбоцитів та ширини розподілу тромбоцитів після взаємодії з кров'ю показали, що показники ацетату ( $14,9 \pm 0,4$  фл.), ( $17,8 \pm 0,3$ ) та аскорбату хітозану ( $11,5 \pm 0,3$  фл.), ( $14,4 \pm 0,5$ ) достовірно відрізнялись від контрольного зразка ( $10,7 \pm 0,3$  фл.), ( $12,4 \pm 0,4$ ) ( $p < 0,05$ ). Для оксалату та лактату хітозану зміни були не суттєві ( $p > 0,05$ ).

Результат коагулограми досліджуваної крові показав, що протромбіновий індекс зразків ацетату ( $99 \pm 3$ ), асорбату ( $98 \pm 2$ ), лактату хітозану ( $97 \pm 2$ ) був нижче контролю ( $108 \pm 3$ ), проте ця різниця була не достовірна ( $p > 0,05$ ). АЧТЧ ацетату ( $38,4 \pm 1,2$  с.) та аскорбату хітозану ( $38,7 \pm 1,7$  с.) був дещо вище контрольного зразка ( $31,9 \pm 1,5$  с.) та відмінність теж була не достовірною ( $p > 0,05$ ).

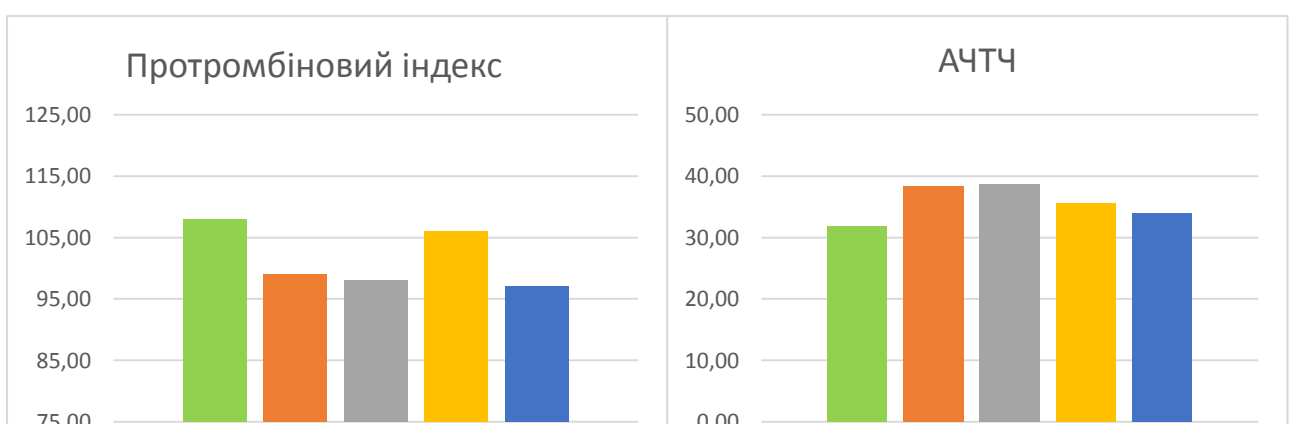




Рисунок 3.13 – Протромбіновий індекс та АЧТЧ.

Фібриноген у зразку крові оксалату хітозану ( $2,5 \pm 0,4$  г/л) був нижче від контролю ( $2,8 \pm 0,3$  г/л) та решти зразків, але різниця була не достовірною ( $p > 0,05$ ). Результати МНВ показали схожі дані для усіх дослідних зразків так і у порівнянні з контрольним різниця була не суттєва ( $p > 0,05$ ).

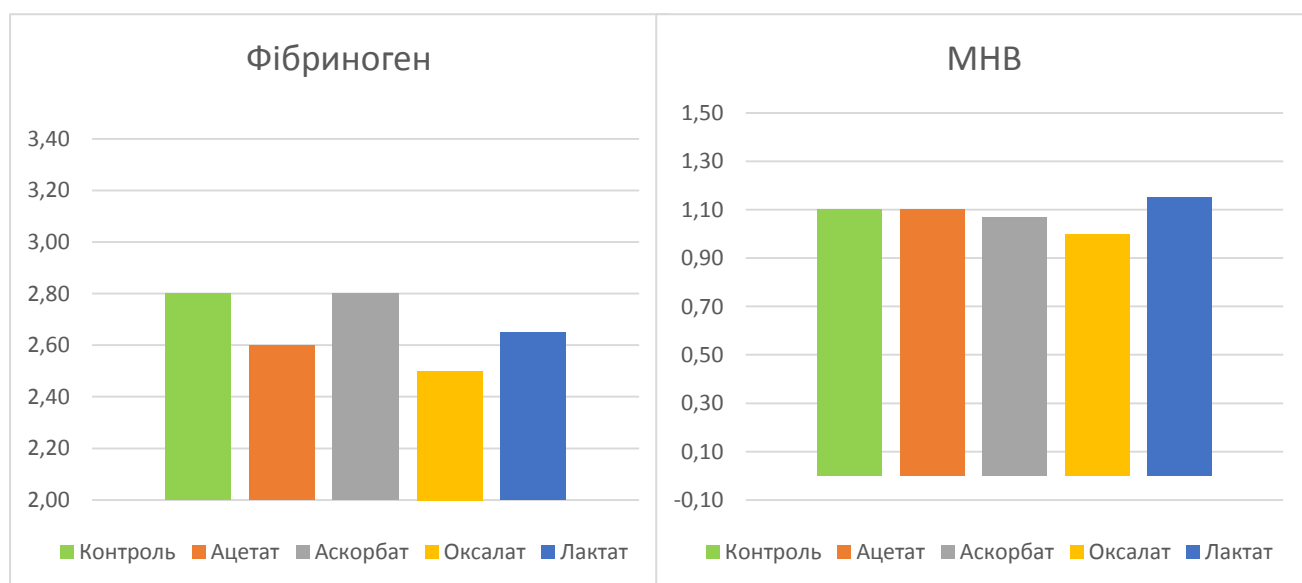


Рисунок 3.14 – Показники фібриногену та МНВ після взаємодії з кров'ю.

Протромбіновий та тромбіновий час усіх зразків також не мав достовірних відмінностей у порівнянні з контрольним зразком ( $p > 0,05$ ). Це може свідчити, що жоден зразок губки на основі хітозану не здатний впливати на стадію коагуляційного гемостазу

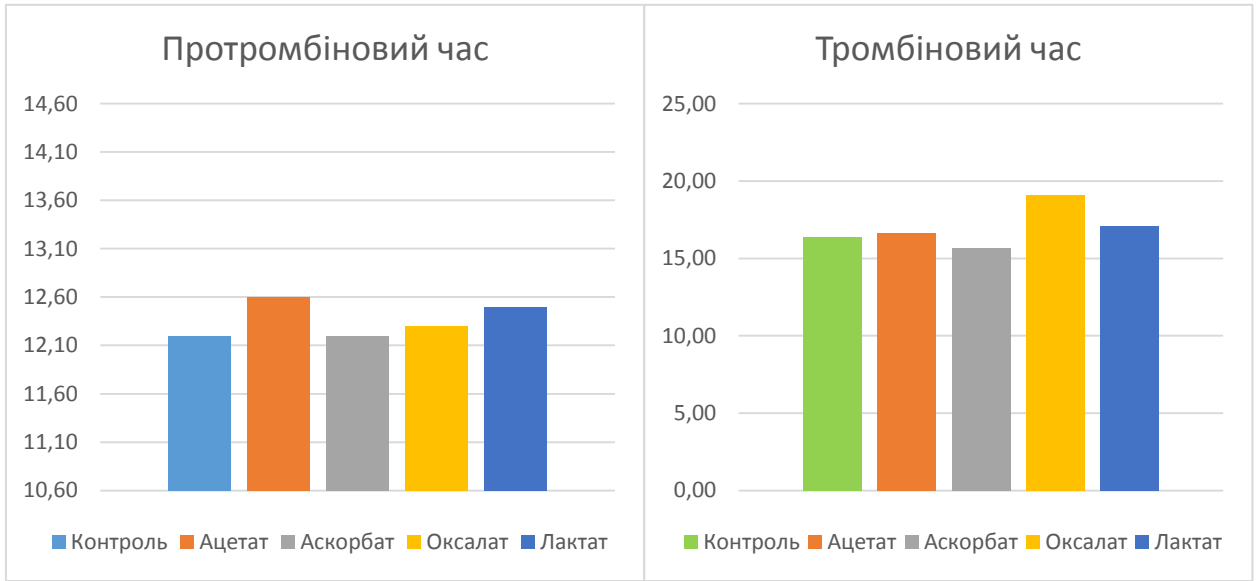
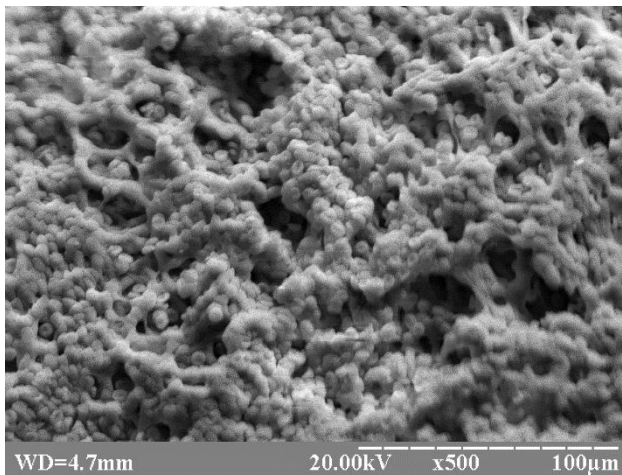
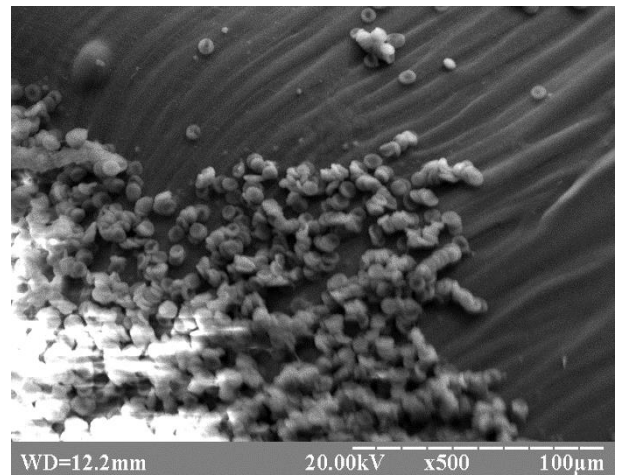


Рисунок 3.15 – Показники протромбінового та тромбінового часу після взаємодії з кров'ю.

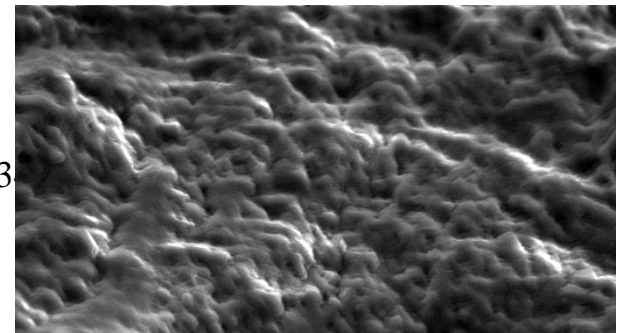
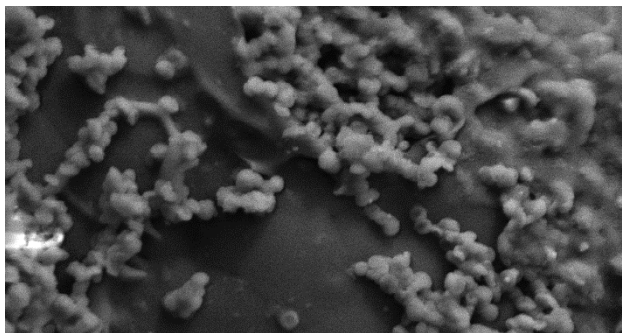
Після взаємодії з кров'ю проведено дослідження поверхні хітозанових губок за допомогою СЕМ. На поверхні ацетату хітозану сконцентрована велика кількість еритроцитів та активованих тромбоцитів які з одної сторони прикріпились до губки, а з іншої утримують еритроцити утворюючи згусток, що відповідає судинно-тромбоцитарній стадії гемостазу.



Ацетат хітозану



Аскорбат хітозану



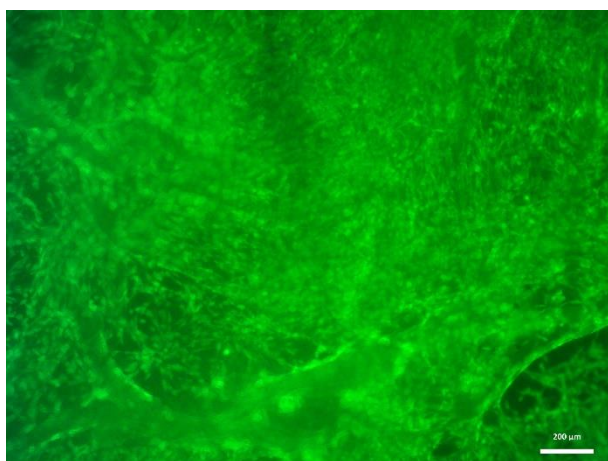
### Оксалат хітозану

### Лактат хітозану

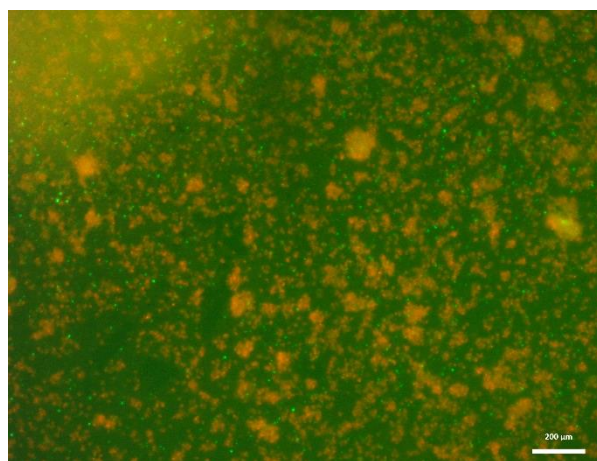
Рисунок 3.16 – Растрова мікроскопія поверхні губок після взаємодії з кров'ю. Зб. х 500 – 600.

На поверхні аскорбату та оксалату хітозану 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.

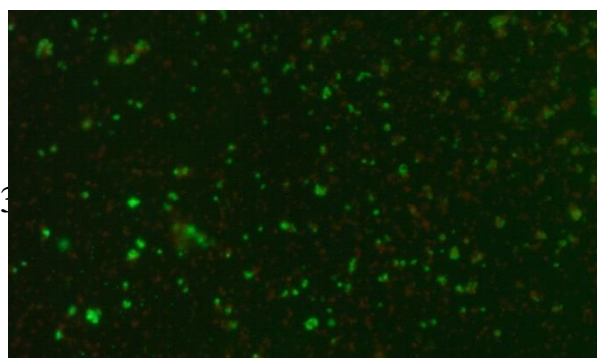
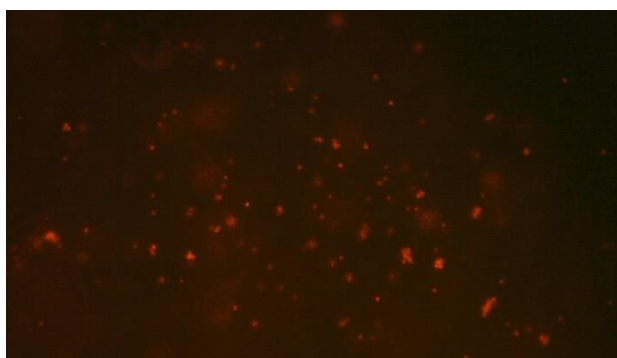
Дослідження цитотоксичності губок через 7 днів культивування свідчать, що губки ацетату хітозану з транексамовою кислотою не токсичні, високоадгезивні для культури клітин, а також сприяють росту та розпластуванню фібробластів на своїй поверхні.



Ацетат хітозану



Аскорбат хітозану



### Оксалат хітозану

### Лактат хітозану

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

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.

Таким чином, 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.





А

Б

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 3.20 – 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.) ( $p > 0,05$ ).

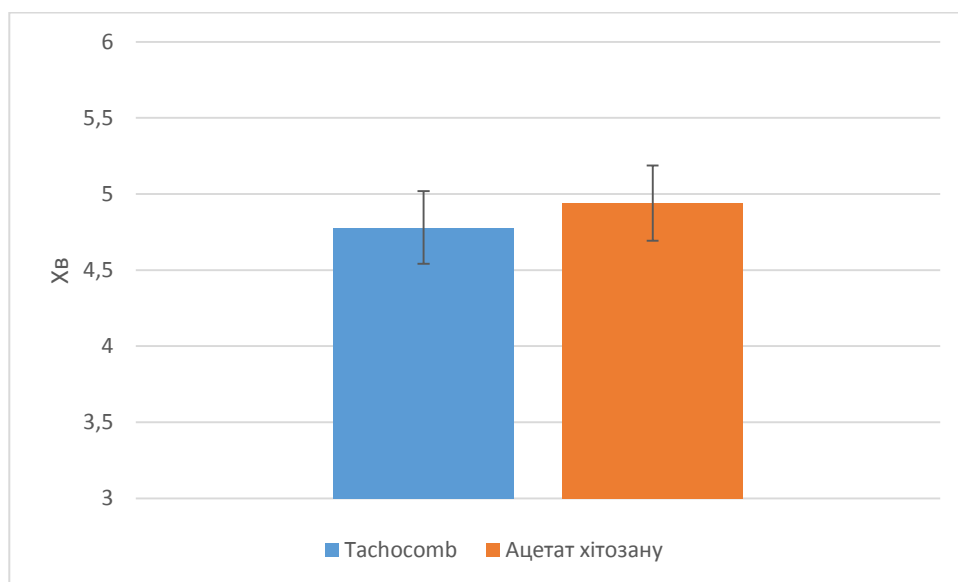


Рисунок 3.21 – Час зупинки кровотечі у щурів.

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

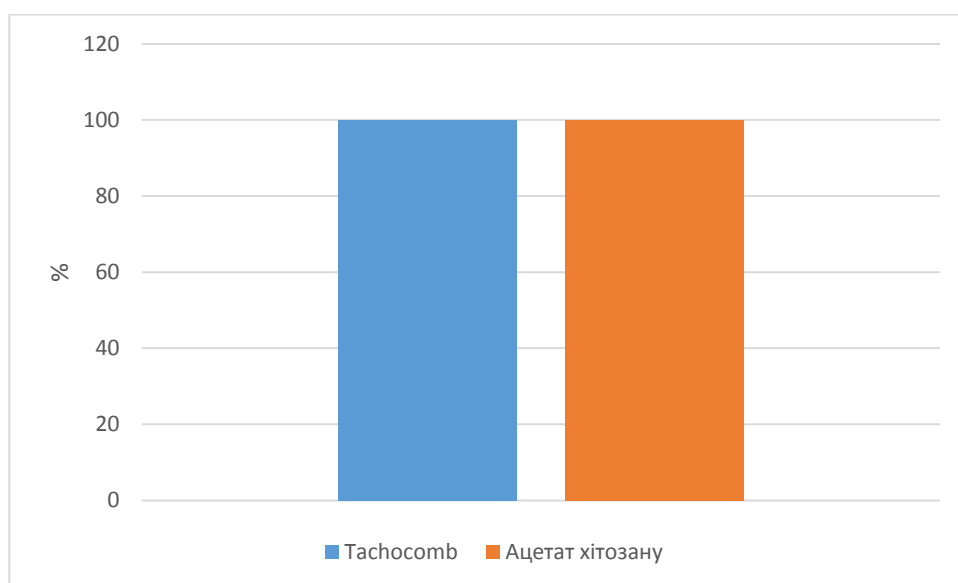


Рисунок 3.22 – Ефективність зупинки кровотечі у щурів.

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



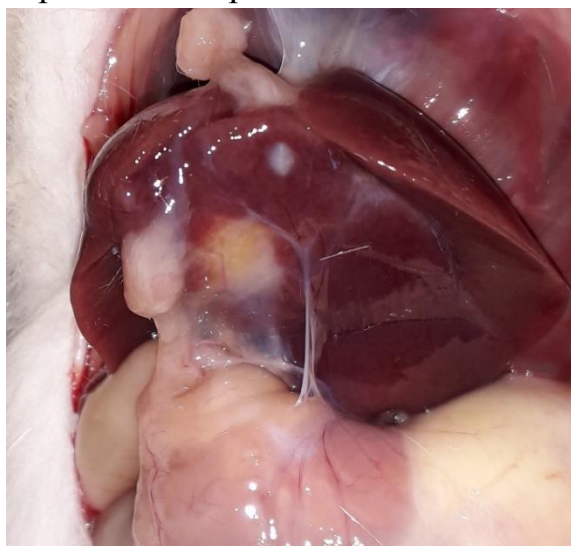
А



Б

Рисунок 3.23 – Частка печінки після зупинки кровотечі у щурів з використанням: А - пластини Tachosomb, Б – хітозаної 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.



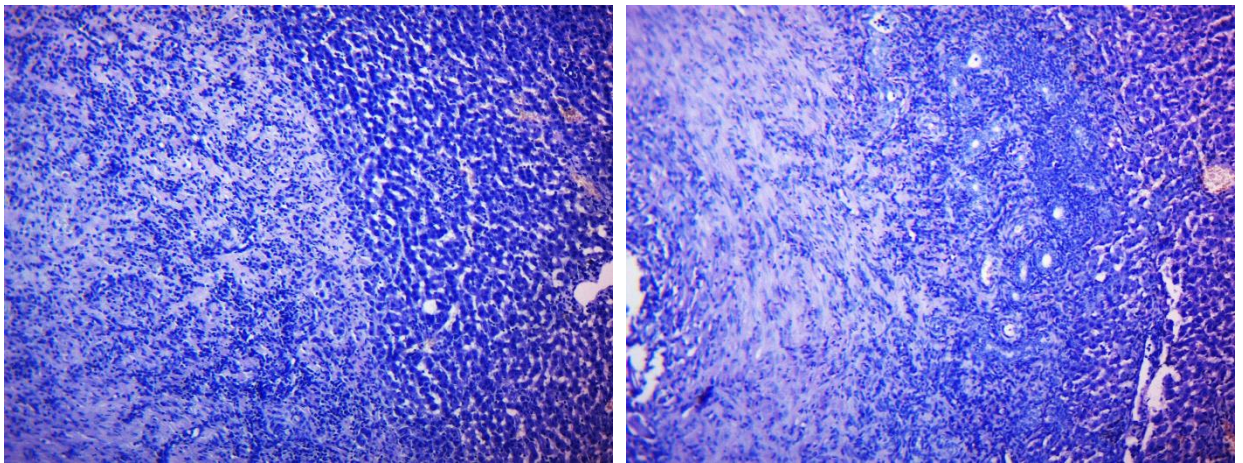


А

Б

Рисунок 3.24 – Печінка щурів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachosomb, Б – хітозаної губки.

Гістологічне дослідження показало, що для обох груп тварин довкола гемостатичних матеріалів було характерне формування помірної запальної реакції. Мембрана Tachosomb 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 3.25 – Печінка щурів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachosomb, Б – хітозаної губки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб 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.

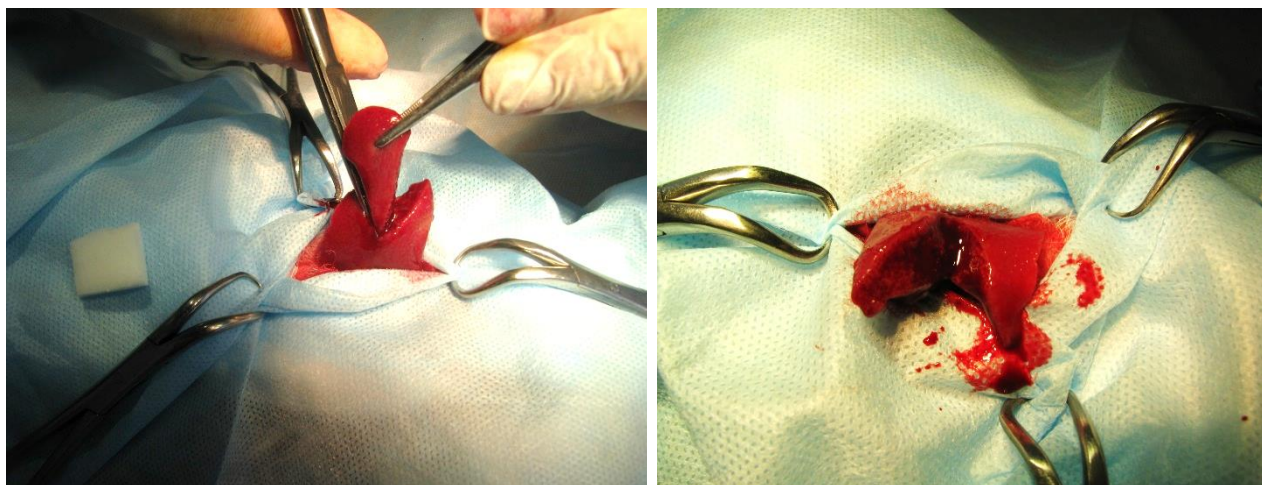
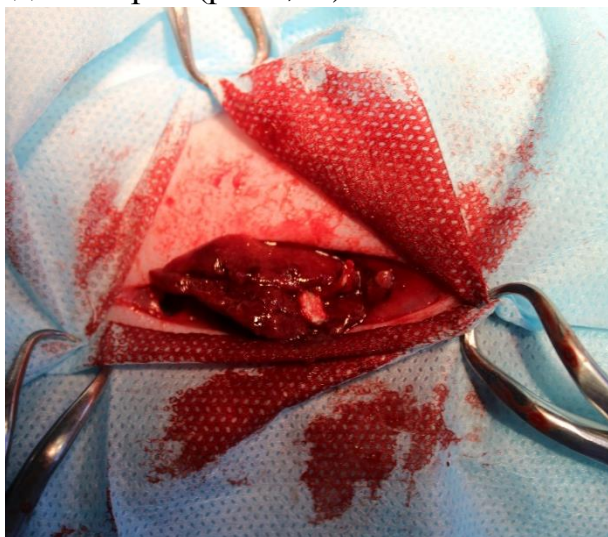


Рисунок 3.26 – Моделювання кровотечі з паренхіми лівої медіальної частки печінки кроля.

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 ( $p > 0,05$ ).



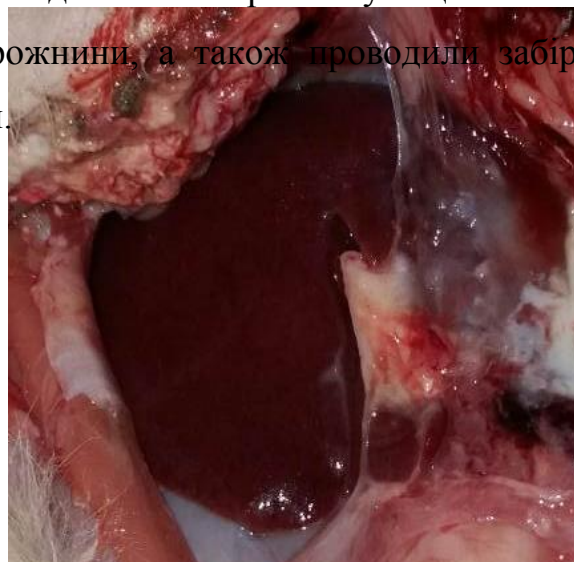
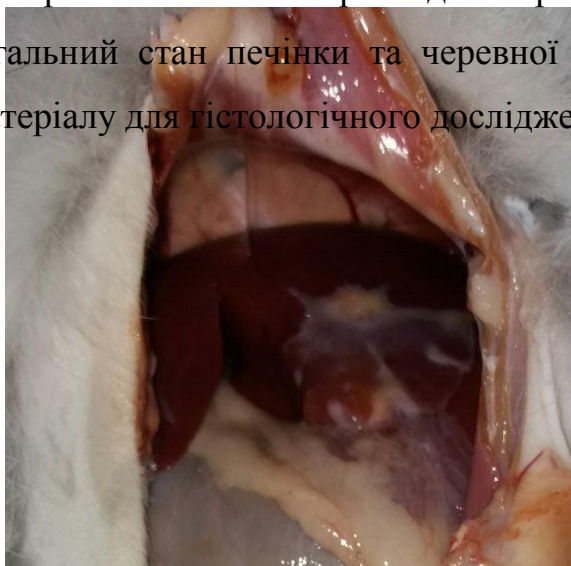


А

Б

Рисунок 3.27 – Частка печінки після зупинки кровотечі у кролів з використанням: А - пластини Tachocomb, 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.

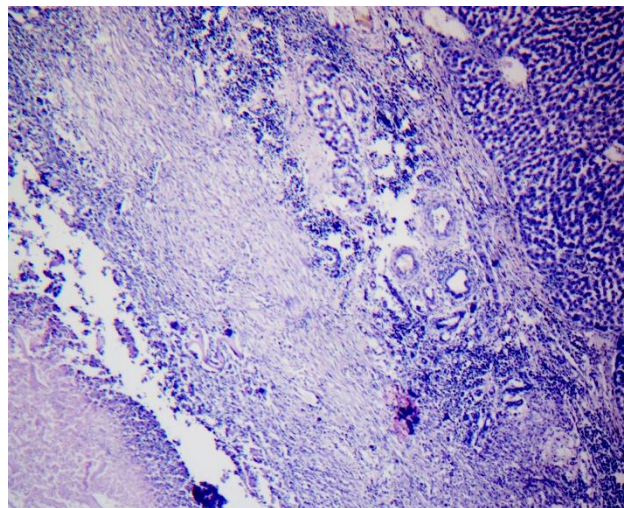
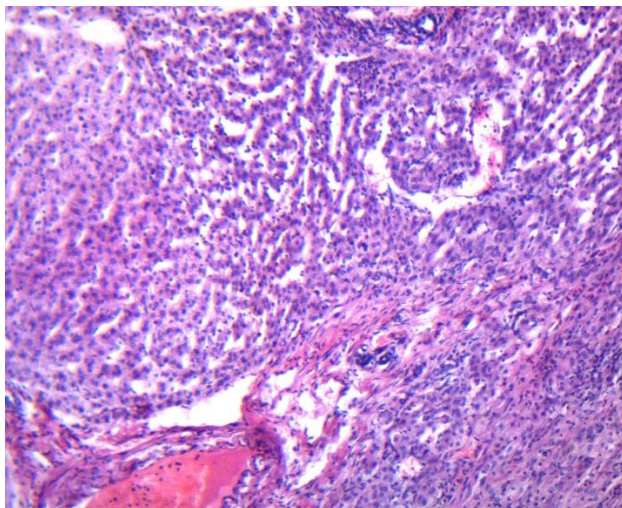


А

Б

Рисунок 3.28 – Печінка кролів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachocomb, 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 3.29 – Печінка кролів на 7 добу після зупинки кровотечі з використанням: А - пластини Tachocomb, 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 Tachocomb 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 Tachocomb.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Найбільш частим ускладненням усіх хірургічних втручань на печінці є кровотеча. Смертність у наслідок кровотечі під час цих втручань становить 3% -14 % [55]

Розроблено різні хірургічні підходи та технології для запобігання і зупинки паренхіматозної кровотечі печінки, такі як: Pringle маневр, накладання швів, селективний судинний контроль, компресія, целюлозні волоконні мембрани, желатинові губки, мікрофібрилярний колаген, біополімери хітозану, водяні струмені скальпелі, гармонічні скальпелі та мікрохвильові коагулятори [56]

Печінка – це орган що має найбільшу кількість судин в тілі людини. Печінкова паренхіма не має гладкої мускулатури і містить рідкі колагенові волокна. Ці характеристики важливими при кровотечі тому, що 1) вазоконстрикція не може відбутися, оскільки немає гладких м'язів та 2) шви паренхіми схильні до прорізування через недостатній колагеновий каркас. При патологічних станах таких як цироз, порушення функції згортання крові, повторна кровотеча ще більше ускладнює досягнення гемостазу [57]

Завдяки своїй ефективності, простоті застосування та доступності у порівнянні з дороговартісним обладнанням для зупинки кровотечі з ран печінки найбільшого поширення набули біоматеріали у вигляді губок, пластин, мембран та ін.

Ідеального матеріалу, який би був ефективним при будь яких об'ємах кровотечі з печінки ще не має. Він повинен бути абсолютно не токсичним, біосумісним, піддаватись біодеградації, мати відносно не велику собівартість.

Одним з перспективних матеріалів для використання з гемостатичною метою є хітозан. Він є похідним хітину та утворюється шляхом деацетилювання хітину за допомогою хітинази. Із 80-х років XIX ст. цей матеріал використовується у медичній практиці. Наразі існують комерційні матеріали на основі хітину та хітозану у вигляді нанофібрил, плівок, гранул, мазей, тощо. Хітозан та його сполуки не токсичні, що доведено чисельними *in vivo* та *in vitro* дослідженнями [58].

Найбільш розвинена галузь застосування хітозану – це матеріали для регенерації тканин, каркаси для тканинної інженерії. До позитивних ефектів хітозану необхідно віднести протизапальну та імуностимулюючу активність, виражений антимікробний і антиоксидантний ефекти, і що дуже важливо – гемостатичну властивість. Незважаючи на широке використання хітозану в практиці, залишається відкритим питання – оптимізації, ступеня деацетилювання хітину, молекулярної маси хітозану, комбінування з іншими сполуками для створення кінцевого продукту.

Тому метою нашого дослідження є вивчення місцевого гемостазу печінки лабораторних тварин при застосуванні губок з ацетату хітозану у поєднанні з транексамовою кислотою.

Матеріал для дослідження був розроблений спільно з Інститутом прикладної фізики НАН України (м. Суми) та являє собою губки з ацетату, аскорбату, оксалату та лактату хітозану молекулярною масою – 300 кДа та концентрацією 3 % у поєднанні з транексамовою кислотою у ваговому співвідношенні 2:1. Для вибору оптимального матеріалу, який буде використовуватися для місцевої зупинки кровотечі печінки були проведені:

растрова електронна мікроскопія – для визначення особливостей рельєфу поверхні; визначення швидкості деградації плівок; дослідження цитотоксичності на культурі фібробластів.

Після фізико-хімічного та токсикологічного оцінювання губок було визначено, що ацетат хітозану є найбільш ефективним зразком. Саме його було вибрано для подальшого дослідження на лабораторних тваринах.

Дослідження було проведено на 22 білих лабораторних щурах зрілого віку та 10 кролях породи «Шиншила». Усім тваринам в умовах стерильної операційної було виконано лапаротомію та травмовано печінку для винекнення паренхіматозної кровотечі.

У контрольній групі тварин кровотечу зупиняли шляхом застосування мембрани Tachcomb. Експериментальній серії тварин місцевий гемостаз проводили губкою з ацетату хітозану з транексамовою кислотою. Оцінювали швидкість та ефективність зупинки кровотечі. Упродовж усього терміну проведення експерименту оцінювали їх загальний стан, активність, поведінкові та харчові реакції. Тварин виводили з експерименту на 7-му добу. За допомогою гістологічного дослідження оцінювали реакцію печінки на наявність гемостатичних матеріалів.

Дослідження зразків методом растрової електронної мікроскопії показало, що будова хітозанових губок відрізнялась залежно від виду розчинника. Так лактат хітозану мав добре виражену трьохвимірну пористу структуру, ацетат та лактат хітозану на своїй поверхні мали пори різного розміру. Відомо, що наявність рельєфу, особливо у нано- та мікродіапазоні, є сприятливим чинником для адгезії клітин. А пориста структура надає губкам сорбційних властивостей. На поверхні оксалату хітозану були сконцентровані гострокінцеві пори солей щавлевої кислоти, що може негативно вплинути на взаємодію з поверхнею губки клітин. Дослідження

пористості показало, що ацетат хітозану має майже вдвічі більший об'єм пор ніж інші зразки.

Результатом деградації губок у розчині SBF було те, що оксалат хітозану повністю розчинився за 5 хв. при чому різко змістивши рН у кислу сторону (рН – 3,34). Дана властивість може завадити практичному застосуванню так деградація проходить надто швидко, а кислий рівень рН може нашкодити оточуючим тканинам і подовжити час згортання крові. Найбільш стабільну деградацію за визначені проміжки часу показав аскорбат хітозану. Ацетат хітозану активно піддавався деградації перші 15 хв., потім цей процес став повільнішим. На 7-му добу деградація знову пришвидшилась і на 14-ту добу закінчилась. Деградація лактату хітозану за перші 15 хв. майже призупинилась, а потім до кінця першої доби деградація збільшувалась. З 1 по 14 добу деградація лактату хітозану знову уповільнилась. Швидкість деградації не повинна бути менше 3 діб, що б забезпечити надійний гемостаз. Але занадто довгий період перебування біоматеріалу в паренхімтозному органі теж не бажаний. Це може призвести до інкапсуляції чи гранульоматозного запалення.

Не зважаючи на швидку радацію, за першу годину вихід транексамової кислоти для лактату та аскорбату хітозану не перевищував 20 %. Ацетат хітозану починаючи з 15 хв. показав активний вихід транексамової кислоти, що на кінець 1 години у 4 рази перевищував інші зразки. Даний параметр важливий для профілактики рецидиву кровотечі.

Усі 3 зразки показали стабільний рН за 24 години дослідження, а от сорбція аскорбату хітозану у 2 рази були меншою в порівнянні з ацетатом та оксалатом хітозану. Здатність сорбувати плазму крові та її компоненти значно підвищує гемостатичний ефект.

Реакція аглютинації еритроцитів з гелями хітозану показала, що лише ацетат і аскорбат здатні аглютинувати еритроцити, безумовно це не може

бути основним гемостатичним ефектом, але однозначно дана властивість може допомагати утворювати червоний тромб на етапі судинно-тромбоцитарного гемостазу.

Дослідження *in-vitro* сорбції крові після взаємодії губок з донорською кров'ю у вакутайнері підтвердило, що ацетат хітозану зданий сорбувати таку кількість плазми крові, що у 40 раз перевищує вагу губки, і в 1,5 – 2 рази більше ніж інші види губок.

Після взаємодії донорської крові з губками був проведений її клінічний аналіз та коагулограма. За його результатами було відомо, що такі показники як гемоглобін, гематокрит, кількість еритроцитів достовірно не відрізнялись від контролю. Проте значно знижувалась кількість тромбоцитів, яка на 10 % була нижче контролю. Зменшення кількості тромбоцитів пояснюється тим, що вони прореагували з губкою, в результаті чого відбулася їх агрегація та адгезія на поверхні губки. Також достовірно збільшився середній об'єм тромбоцитів та ширина розподілу тромбоцитів. Ці параметри можуть опосередковано вказувати на активацію тромбоцитів у результаті чого змінюється їх форма та розмір. Жоден з результатів коагулограми: протромбіновий індекс, тромбіновий час, протромбіновий час, АЧТЧ, МНВ, фібриноген для усіх зразків губок не мав достовірної різниці з контролем. Це може свідчити про те, що хітозанові губки беруть участь лише у судинно-тромбоцитарній стадії гемостазу і не впливають на коагуляційний гемостаз.

Растрова електронна мікроскопія зразків губок після взаємодії за кров'ю підтвердила попередні результати. На поверхні лактату хітозану можна побачити лише незначну кількість тромбоцитів. Аскорбат та оксалат хітозану на своїй поверхні окрім адгезованих тромбоцитів мали додатково і помірну кількість еритроцитів, що прикріпились до них. Ацетат хітозану показав найкращу адгезивну властивість – вся його поверхня укрита шаром фіксованих тромбоцитів та еритроцитів.



Дослідження цитотоксичності та адгезивності губок проведених на культурі фібробластів показали, що оксалат є непридатним до застосування на живих моделях так як мав абсолютну цитотоксичність. Аскорбат та лактат хітозану проявили мінімальну адгезивну властивість, проте мали помірну цитотоксичність, що не робить їх перспективними для подальших досліджень у даній формі. Ацетат хітозану показав відсутність токсичного впливу, високу адгезивність та проявив стимулюючий ефект на фібробласти. Тому ацетат хітозану було вибрано для подальшого дослідження.

Результати експериментального дослідження показали, що хітозанові губки були однаково ефективні, як і мембрани Tachocomb. Кровотеча була зупинена у всіх спостереженнях, а час кровотечі не мав достовірної різниці з контрольною групою. Моделювання ран печінки різної форми (у щурів циліндричний дефект на всю товщу паренхіми, а у кролів клиноподібний дефект) дало можливість виключити зупинку кровотечі за рахунок тампонування рани і підтвердило ефективність губки.

Гістологічне дослідження через 7 діб після експерименту показало помірний розвиток грануляційної тканини в обох групах тварин. Лімфоцитарна інфільтрація була дещо вища у експериментальній групі. В обох групах виявлені макрофаги на периферії імплантатів. У зразках експериментальної групи виявлена помірна гіпертензія в біліарних протоках. Це, а також некроз крайової зони паренхіми у частини тварин обох груп можна пояснити недоліком моделі рани печінки. Так, можливо, що для даних тварин, це занадто значне пошкодження і велика кількість гемостатичного матеріалу по відношенню до маси печінки лабораторних тварин.

## **ВИСНОВКИ**

В магістерській роботі наведено результати фізико-хімічного дослідження хітозанових губок. Продемонстровано ефективність ацетату хітозану при місцевій зупинці кровотечі з ран печінки лабораторних тварин.

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 «Tachocomb».
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.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 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 літератури)», 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 журнал*, 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. Пахлеваян, 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 li, p 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.