

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.115.3+615.273.52

Корригирующее действие хитозана на параметры гемостаза в условиях гипокоагуляции, вызванной антиагрегантом клопидогрелем

Л.А. Ляпина^{id}, М.Е. Григорьева^{id}, Т.Ю. Оберган^{*}^{id}, Т.А. Шубина^{id}

Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова, кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: tobergan@mail.ru

Изучалось действие хитозана в условиях *in vitro* на плазме крови здоровых крыс и крыс с приобретенной кровоточивостью, вызванной применением антиагреганта клопидогреля, необратимо ингибирующего P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов. Показана независимость степени прокоагулянтной активности хитозана от времени инкубации (5 и 30 мин при 37°C) при добавлении его к пулу плазмы крови от здоровых животных. Однако при этом отмечено значительное снижение (на 27%) фибриндеполимеризационной активности плазмы крови, которая еще более подавляется (на 42%) с увеличением времени инкубации. При добавлении хитозана к гипокоагуляционной плазме, полученной после перорального введения крысам клопидогреля (однократно, перорально в дозе 5 мг/кг) и инкубации в течение 5 мин, установлена резко выраженная активация свертываемости крови, о чем свидетельствовали повышенные значения концентрации фибриногена (на 37%), полимеризации фибрина (на 51%) и агрегации тромбоцитов (на 36%) при одновременном значительном снижении фибриндеполимеризационной активности крови (на 47%). При удлинении времени инкубации гипокоагуляционной плазмы с хитозаном наблюдались более выраженные эффекты этого препарата, что проявлялось в значительном повышении концентрации фибриногена, агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижении тромбинового времени, характеризующего общий путь свертывания крови. Итак, кровоостанавливающий препарат хитозана приводит к блокаде явлений кровоточивости, вызываемой применяемым в клинике клопидогрелем, что впервые показано в данной работе.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, гипокоагуляция, клопидогрель, полимеризация фибрина, система гемостаза, фибринстабилизирующий фактор, хитозан

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-5

Список сокращений:

PDGF-AB – производное от тромбоцитов фактора роста-AB (Platelet-derived growth factor AB);
 TGF-β1 – трансформирующий фактор роста-β1 (Transforming growth factor β1);
 АТ – агрегация тромбоцитов;
 АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время;
 ГКП – гипокоагуляционная плазма;
 ПФ – полимеризация фибрина;
 ТВ – тромбиновое время;
 FIX – фактор свертывания IX;
 FXIIIa – фактор свертывания XIIIa;
 ФДПА – фибриндеполимеризационная активность;
 ХТЗ – хитозан.

Введение

Одной из актуальных проблем современной физиологии и медицины является коррекция нарушений свертываемости крови, обусловленных или тромбообразованием, или кровоточивостью. Для борьбы с гиперкоагуляцией используют хорошо известные антикоагулянты, антиагреганты и фибринолитики, тогда как для устранения явлений кровоточивости применяют достаточно ограниченное количество лечебных средств. Однако тяжелые вирусные инфекции, хирургические и нехирургические травмы и многие другие патологии, а также ранения в условиях чрезвычайных ситуаций потенциально опасны в плане развития серьезных геморрагических нарушений, что требует поиска новых природных нетоксичных кровооста-

навливающих препаратов направленного и быстрого действия. Были разработаны новые гемостатические материалы на основе полисахаридов (хитозан, гиалуроновая кислота, альгинат, целлюлоза, циклодекстрины, крахмал, декстран и каррагинан), пептидов (самосборные пептиды) и белков (фиброин шелка, коллаген, желатин, кератин и тромбин). Эти новые материалы демонстрируют высокую гемостатическую эффективность благодаря активации различных механизмов в системе гемостаза [1]. Кровоостанавливающие полисахаридные средства широко используются для лечения не только наружных и внутренних кровотечений, но и массивных кровоизлияний [2].

В последнее время все большее внимание уделяется биополимерам на основе хитозана как биологически активным веществам с высокими кровоостанавливающими свойствами. Хитозан представляет собой полисахарид, полученный из хитина ракообразных, обладает широким спектром биологических активностей, в том числе гемостатической, а также хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью и нетоксичностью [3, 4]. Он применяется в биомедицине, сельском хозяйстве и фармацевтической промышленности, в том числе в области лекарственных средств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и тканевой инженерии [5]. По сравнению с другими доступными полисахаридами хитозан обладает низкой молекулярной массой, более высокой степенью дезацетилирования и полимеризации, что наделяет его уникальными биологическими эффектами, такими как антимикробные, антиоксидантные, противоопухолевые, противовоспалительные, антибактериальные и антигипертензивные, а также способностью к доставке лекарств. Кроме того, он проявляет антидиабетическое и гипохолестеринемическое, а также направленное против ВИЧ-1 и болезни Альцгеймера действие в организме. Вследствие более высокой клеточной трансдукции хитозан полностью всасывается через кишечный эпителий благодаря своей катионной сфере, экспонируемой на более коротких N-глюкозаминовых единицах [6]. В настоящее время очень активно используют хитозановые повязки для местного применения. Продemonстрировано, что повязка из хитозана является как прокоагулянтом, так и эффективным противомикробным средством, способствуя заживлению ран [7]. Хитозан и его производные стали актуальными темами исследований в области производства гидрогелевых повязок для ран благодаря их уникальной молекулярной структуре и разнообразной биологической активности. По сравнению с традиционными средствами, такими как марля и бинт, гидрогель способен поглощать и удерживать больше воды, не растворяясь и не теряя своей трехмерной структуры, что позволяет избежать вторичного повреждения и способствует заживлению ран [8].

Отмечается, что местные методы лечения перооперационных кровотечений при гемофилии в настоящее время ограничены фибриновыми клеями. Недостатки фибриновых клеев включают риск заражения патогенами, переносимыми через кровь и перекрестную иммунологическую реакцию на факторы II и V. Хотя местные гемостатические средства доступны для лечения травматических кровотечений в полевых условиях военными и специалистами скорой медицинской помощи, их эффективность для лечения кровотечений при гемофилии, нарушениях тромбоцитарной системы, хирургических вмешательствах и для лечения других дефектов гемостаза, наблюдаемых при циррозе и других заболеваниях печени, а также при передозировке антикоагулянтной терапии, не изучалась. Новый гранулированный гемостатик из смектита WoundStat™ продемонстрировал 100%-ную эффективность в обеспечении гемостаза при травматическом артериальном кровотечении под высоким давлением и был разрешен для наружного применения в случаях кровотечений средней и тяжелой степени [9].

Перспективным является применение наночастиц хитозана при гемофилии В, вызванной дефицитом фактора свертывания IX (ФІХ). При исследовании пероральной доставки генов на основе катионного биополимера хитозана было показано, что наночастицы хитозана защищают инкапсулированную ДНК от переваривания в желудочно-кишечном тракте и усиливают усвоение в кишечнике за счет улучшения транс- и параклеточной проницаемости кишечника и ее мукоадгезивных свойств [10].

В других работах указывается на применение хитозановых прокладок у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, когда часто развивается коагулопатия, которая может усилить кровотечение из места прокола после извлечения иглы. Сообщалось, что прокладки на основе хитозана ускоряют гемостаз даже при наличии коагулопатии [11].

Сообщается об эффективности системы, включающей хитозан (иммобилизованный тромбин на рентгеноконтрастных эмболических микросферах из поливинилового спирта/хитозана), для точной локализации и местного свертывания крови при артериальной эмболизации. Эта система может действовать как рентгеноконтрастный и гемостатический эмболический агент для повышения эффективности эмболизации [12].

Известно, что хитозан относится к кровоостанавливающим препаратам, свойства которого зависят от структуры, молекулярной массы, степени дезацетилирования и сульфатирования [13, 14]. Один из механизмов кровоостанавливающего действия хитозана обусловлен связыванием его положительно заряженных групп с отрицательно заряженными эритроцитами с образованием гелеобразного сгуст-

ка в месте контакта с кровью [15]. Изучено влияние хитозана с различной молекулярной массой на структуру и функцию свертывающих белков плазмы крови и показано, что он образует комплексы с фибриногеном за счет электростатического притяжения, при этом структура и конформация фибриногена изменяются [3, 16]. Кроме того, хитозан способен взаимодействовать с низкомолекулярным гепарином, для чего важны его степень деполимеризации и молекулярная масса [17]. Установлено, что хитозан обладает умеренной прокоагулянтной активностью при введении в организм, поскольку не выявлено его значительного влияния на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [16, 18, 19]. Также хитозан в определенной мере понижает риск гемолиза в зависимости от дозы и молекулярной массы, при его высокой концентрации наблюдается необратимая агрегация тромбоцитов [18]. Изменения параметров тромбоэластограммы под действием хитозана демонстрируют сдвиг процесса свертывания крови в сторону гиперкоагуляции [16].

Ранее в наших экспериментах было показано, что в условиях *in vitro* и при пероральном введении хитозана здоровым животным наблюдается усиление свертываемости крови за счет повышения агрегационной функции тромбоцитов, снижения фибринолитического потенциала крови и возрастания степени полимеризации фибрина [19, 20]. Многие авторы подтверждают, что хитозан активирует свертываемость крови человека, слабо влияя на контактную фазу свертывания крови, незначительно и кратковременно активируя систему комплемента и не оказывая действия на внутренний путь каскада коагуляции [21]. Однако при прямом контакте хитозана с кровью могут возникать воспалительные реакции, что ограничивает его использование в случае системного введения, тогда как при местном применении такие побочные эффекты отсутствуют [22].

До настоящего времени механизмы действия хитозана на свертывание крови при гипокоагуляции, вызванной некоторыми лекарственными препаратами, до сих пор остаются неясными. Известно, что терапия антикоагулянтами и антиагрегантами с высокой долей вероятности может приводить к возникновению эпизодов кровоточивости в организме. При этом риск геморрагических осложнений существенно возрастает при длительном и бесконтрольном применении антитромботических препаратов, а также при их передозировке.

Один из известных применяемых в клинике антиагрегантов — клопидогрель — относится к классу тиенопиридинов. Он ингибирует агрегацию тромбоцитов, вызывая необратимые изменения в рецепторе P2Y₁₂, а также является препаратом, механизм действия которого заключается в снижении экспрессии гликопротеина IIb/IIIa,

рецептора фибриногена на поверхности тромбоцитов [23]. При этом происходят снижение ингибирующего действия активатора агрегации тромбоцитов АДФ на аденилатциклазу, уменьшение высвобождения биологически активных веществ из гранул тромбоцитов, блокада связывания фибриногена с рецептором тромбоцитов гликопротеином IIb/IIIa [24].

Уникальные биологические свойства и преимущества препаратов на основе хитозана, такие как стабильность, длительный срок хранения и полная растворимость в воде, делают представителей данного класса биологических веществ перспективными для дальнейшего изучения и создания новых средств, оказывающих влияние на процессы гемостаза. Однако необходимо учитывать, что детальное исследование влияния хитозана и препаратов на его основе на систему свертывания крови в условиях пониженной свертываемости крови остается актуальным.

Цель настоящей работы заключается в исследовании влияния хитозана на параметры системы гемостаза и изучении его корригирующего коагулянтного эффекта в условиях моделирования у крыс гипокоагуляции, вызванной широко применяемым в клинической практике антиагрегантом клопидогрелем с известным механизмом действия.

Материалы и методы

В работе использовали сублимированный водорастворимый хитозан (сукцинил хитозана; ООО «Биопрогресс», Россия) и препарат с антиагрегационным действием — клопидогрель (Actavis Group, Мальта), которые перед употреблением растворяли в 0,85%-ном растворе NaCl (ООО «Мосфарм», Россия).

Дизайн исследования. Эксперименты были проведены в условиях *in vitro* с использованием пула плазмы от 20 половозрелых лабораторных белых крыс-самцов Wistar массой 250–280 г, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (Московская обл., Россия). Содержание животных и все экспериментальные процедуры соответствовали международным биоэтическим нормам.

В *первой серии* опытов исследовали влияние хитозана на параметры гемостаза при его добавлении к пулу нормальной плазмы и дальнейшей инкубации образцов в течение 5 или 30 мин (для выявления оптимального временного интервала инкубации). Схема эксперимента представлена на рис. 1А.

К образцам пулированной плазмы (0,1 мл) добавляли 0,05 мл раствора хитозана (10 мг/мл) или физиологического раствора в качестве контроля, инкубировали смесь при 37°C в течение либо 5 мин, либо 30 мин, а затем проводили определение параметров гемостаза.

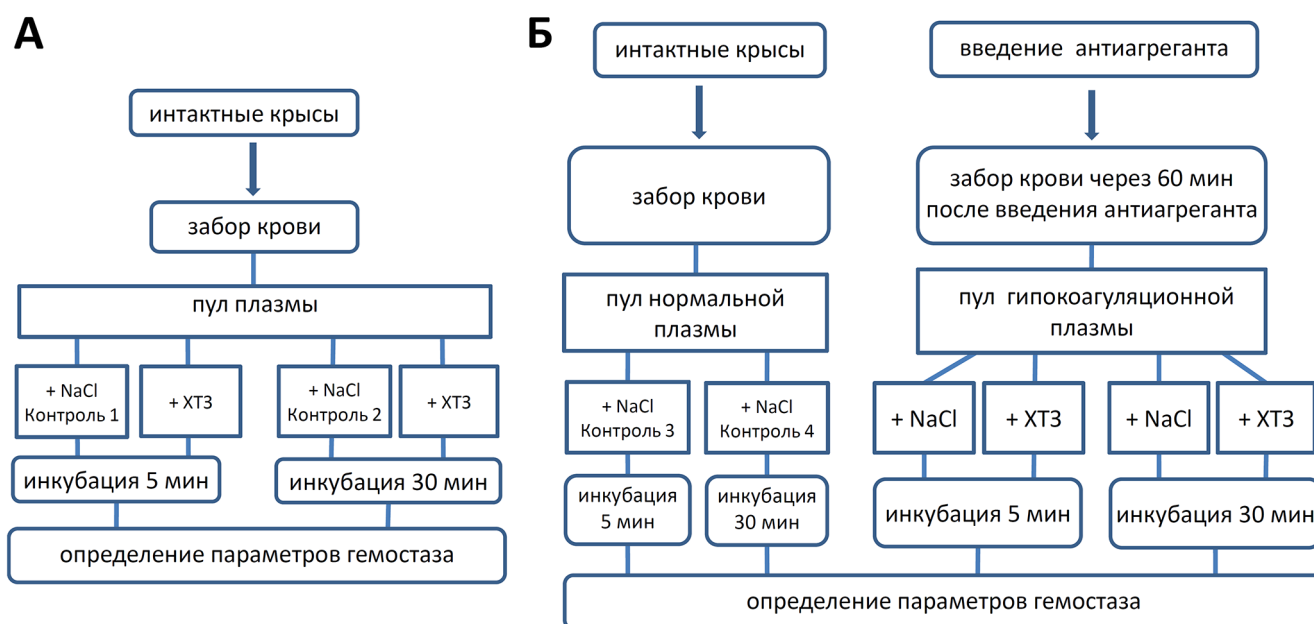


Рис. 1. Схема проведения (А) первой и (Б) второй серии экспериментов. NaCl – физиологический раствор, ХТЗ – хитозан.

Были использованы следующие экспериментальные группы: 1) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 5 мин (группа «Контроль 1»); 2) пул нормальной плазмы с добавлением хитозана (группа «ХТЗ»), инкубация 5 мин (группа «ХТЗ-5»); 3) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 30 мин (группа «Контроль 2»); 4) пул нормальной плазмы с добавлением хитозана, инкубация 30 мин (группа «ХТЗ-30»).

Вторую серию опытов проводили с использованием пула гипокоагуляционной плазмы. Как показано на рис. 1Б, для создания эффекта пониженного свертывания в крови животных использовали препарат, уменьшающий агрегацию тромбоцитов (клопидогрель, однократно, перорально в дозе 5 мг/кг). Затем к 0,1 мл пулированной плазмы крови добавляли 0,05 мл раствора хитозана в концентрации 10 мг/мл или физиологического раствора (в качестве контроля), инкубировали при 37°C в течение либо 5 мин, либо 30 мин, перемешивая образцы каждые 5 мин, а затем выполняли биохимические исследования. В этой серии экспериментов также использовали плазму нормальных здоровых животных, которым за 1 ч до забора крови вместо клопидогреля вводили эквивалентный объем 0,85%-ного NaCl.

Были использованы следующие экспериментальные группы: 1) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 5 мин (группа «Контроль 3»); 2) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 30 мин (группа «Контроль 4»); 3) пул гипокоагуляционной плазмы (ГКП) с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 5 мин (группа «ГКП + NaCl-5»);

4) пул ГКП с добавлением хитозана, инкубация 5 мин (группа «ГКП + ХТЗ-5»); 5) пул ГКП с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 30 мин (группа «ГКП + NaCl-30»); 6) пул ГКП с добавлением хитозана, инкубация 30 мин (группа «ГКП + ХТЗ-30»).

Оценка состояния системы гемостаза. Забор крови у наркотизированных животных (внутрибрюшинное введение 2%-ного раствора ксилазина (Alfasan International B.V., Нидерланды) в количестве 0,2 мл/кг массы тела) и в первой, и во второй серии экспериментов осуществляли из яремной вены (*venae jugularis*) с консервантом 3,8%-ным раствором цитрата натрия (соотношение кровь/консервант = 9/1). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы образцы крови центрифугировали при 1000g в течение 5 мин, а для получения бедной тромбоцитами плазмы – при 3000g в течение 12 мин. После центрифугирования собирали пул плазмы, с которым в дальнейшем проводили исследования.

В образцах бедной тромбоцитами пулированной плазмы определяли концентрацию фибриногена по Клауссу и тромбиновое время (ТВ) с применением стандартных наборов реактивов («Технология-Стандарт», Россия) на анализаторе свертывания крови АСК-2-02-Астра (Россия) и активность фибринстабилизирующего фактора свертывания XIIIa (ФХIIIa) с использованием набора реактивов согласно инструкции производителя (НПО «Ренам», Россия).

Фибринолитическую активность хитозана в условиях *in vitro* оценивали по тестам полимеризации фибрина и фибриндеполимеризационной (или неферментативной) фибринолитической

активности. Фибриндеполимеризационную активность (ФДПА), т.е. способность исследуемого препарата лизировать нестабилизированные ФХПА фибриновые пленки, определяли стандартным способом на пластинах нестабилизированного фибрина, которые готовили с использованием 0,2%-ного раствора фибриногена («Технология Стандарт», Россия) и 0,4%-ного раствора тромбина (Behring, Германия). Фибриновые пластины с нанесенными образцами инкубировали в течение 2 ч при 37°С. После инкубации измеряли зоны лизиса (ФДПА). Расчет степени полимеризации фибрина (ПФ) производили по формуле: $(L_k / L_o) \times 100\%$, где L_k – размер зоны лизиса после инкубации плазмы с физиологическим раствором (контроль), L_o – размер зоны лизиса после инкубации плазмы с хитозаном (опыт).

Исследование агрегации тромбоцитов (АТ) проводили методом Борна на лазерном агрегометре «АЛАТ-2 ЛА 220» (НПФ «Биола», Россия), используя в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Образцы плазмы крови (0,3 мл), обогащенной тромбоцитами, инкубировали с исследуемыми соединениями, затем вносили АДФ (0,05 мл). Определяли агрегацию тромбоцитов в течение 5 мин (за 100% принимали светопропускание плазмы, обедненной тромбоцитами).

Для всех образцов проводили параллельные эксперименты (не менее трех повторов) по каждому методу исследования. В качестве контроля использовали пробы, которые не содержали хитозан.

Исследование всех параметров системы гемостаза проводили согласно стандартным коагулологическим методам [25].

Статистическая обработка данных. 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. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое (М) 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 и обсуждение

Первая серия экспериментов. Показатели гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана к плазме крови здоровых крыс. Как видно из данных табл. 1 и рис. 2, в опытных образцах плазмы крови после добавления хитозана наблюдалась повышенная свертываемость крови по сравнению с контрольными значениями (добавление к пулу плазмы крови физиологического раствора). На это указывало снижение ФДПА, ТВ и повышение АТ, активности фактора XIIIa и ПФ. При этом ФДПА уменьшалась на 27% и 42%, а ТВ – на 18% и 23% при инкубации пула плазмы с хитозаном в течение 5 или 30 мин соответственно. Одновременно происходило увеличение ПФ, активности ФХIIIa и АТ на 30, 28 и 46% (при инкубации хитозана с пулом плазмы в течение 5 мин) и на 35, 13 и 25% (инкубация 30 мин) соответственно по сравнению с контролем. Следует отметить, что концентрация фибриногена в этих условиях практически не изменялась при выбранных временных интервалах инкубации.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о независимости степени прокоагулянтной активности хитозана от времени инкубации. Однако можно отметить, что с увеличением времени инкубации наблюдалось снижение ФДПА (неферментативной фибринолитической активности) плазмы крови.

Вторая серия экспериментов. Параметры гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана к плазме крови при моделировании у крыс гипоклагуляции, вызванной введением антиагреганта клопидогреля. Через 60 мин после перорального введения клопидогреля в крови крыс группы «ГКП + NaCl-5» отмечалось снижение свертывающего потенциала крови, о чем свидетельствовало удлинение ТВ на 21%, а также снижение концентрации фибриногена на 26% и АТ на 23% по сравнению с соответствую-

Таблица 1

Параметры гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана или физиологического раствора к плазме интактных крыс (М ± m)

Группы	ФХIII, ед/мл	Концентрация фибриногена, г/л	ТВ, с	АТ, % светопропускания
<i>Инкубация 5 мин</i>				
NaCl-5 (Контроль 1)	124,8 ± 5,6	3,7 ± 0,3	15,2 ± 0,5	11,3 ± 0,9
ХТ3-5	159,2 ± 4,4**	3,6 ± 0,2	12,5 ± 0,8*	16,5 ± 0,8**
<i>Инкубация 30 мин</i>				
NaCl-30 (Контроль 2)	152,1 ± 4,1	3,1 ± 0,3	19,6 ± 0,9	13,9 ± 0,7
ХТ3-30	172,6 ± 5,1*	2,9 ± 0,2	15,1 ± 0,6**	17,4 ± 1,4*

Примечание: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 1 (добавление физиологического раствора, инкубация 5 мин) или Контролем 2 (добавление физиологического раствора, инкубация 30 мин) соответственно. ФХIII – фактор XIII, ТВ – тромбиновое время, АТ – агрегация тромбоцитов, ХТ3 – хитозан.

ющими показателями у здоровых животных (Контроль 3) (табл. 2). Как видно на рис. 3А, при инкубации ГКП с хитозаном в течение 5 мин (группа «ГКП + ХТЗ») установлено подавление ФДПА на 44% относительно соответствующих значений в Контроле 3. При этом увеличились показатели активности ФХИПа на 34% и степени ПФ — на 45%, что указывало на активацию процессов свертывания крови. При сравнении групп «ГКП + ХТЗ-5» и «ГКП + NaCl-5» выявлены значимые различия по следующим параметрам: ФДПА была снижена на 47%, а ПФ, ФХИПа, концентрация фибриногена и АТ возросли на 51, 16, 37 и 36% соответственно. При увеличении времени инкубации образцов ГКП с хитозаном до 30 мин в исследуемых пробах наблюдалась еще более значительная гиперкоагуляция: ФДПА и ТВ уменьшились на 63 и 23%, а степень ПФ и концентрация фибриногена повысились на 63 и 56% соответственно, по сравнению

с Контролем 4. Сравнение групп «ГКП + NaCl-30» и «ГКП + ХТЗ» выявило значимые различия по следующим значениям: ФДПА и ТВ снизились на 65 и 36%, а ПФ, ФХИПа, концентрация фибриногена и АТ увеличились на 92, 20, 128 и 35% относительно соответствующих показателей в группе «ГКП + NaCl-30» (рис. 3Б).
Итак, при добавлении хитозана к ГКП отмечалась выраженная активация свертываемости крови, о чем свидетельствовали повышенные значения концентрации фибриногена, степени полимеризации фибрина и АТ при одновременном значительном снижении ФДПА крови. При удлинении времени инкубации ГКП с хитозаном наблюдались более выраженные эффекты этого препарата, что выражалось в еще более значительном повышении концентрации фибриногена, АТ, степени ПФ и снижении ТВ, характеризующего общий путь свертывания крови.

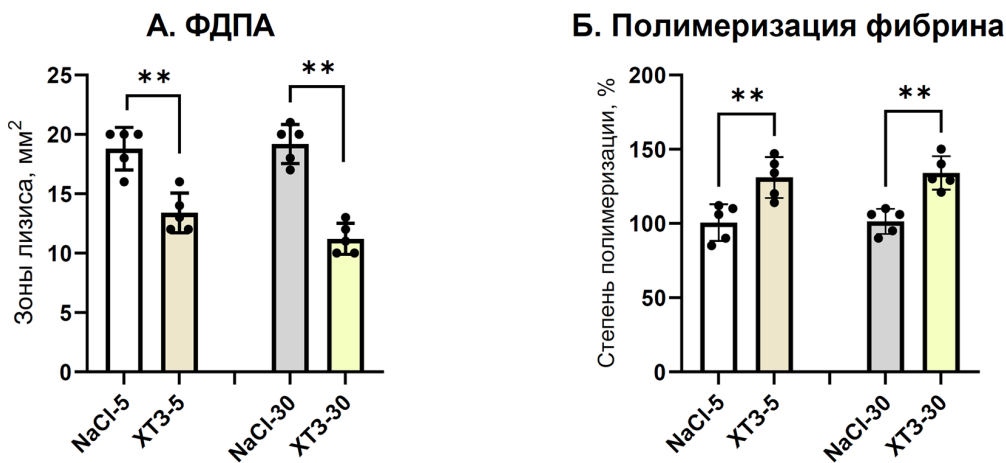


Рис. 2. Фибриндеполимеризационная активность и полимеризация фибрина в условиях *in vitro* при добавлении физиологического раствора или хитозана к плазме интактных крыс с последующей инкубацией образцов в течение 5 мин (А) и 30 мин (Б). Обозначения: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 1 (добавление физиологического раствора, инкубация 5 мин) или Контролем 2 (добавление физиологического раствора, инкубация 30 мин) соответственно. ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ПФ – полимеризация фибрина, ХТЗ – хитозан.

Таблица 2

Параметры гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана или физиологического раствора к плазме крыс с гипокоагуляцией ($M \pm m$)

Группы	ФХП, ед/мл	Концентрация фибриногена, (г/л)	ТВ, с	АТ, % светопропускания
Инкубация 5 мин				
Нормальная плазма + NaCl-5 (Контроль 3)	132,5 ± 8,6	2,7 ± 0,4	11,4 ± 0,1	16,1 ± 0,9
ГКП + NaCl-5	153,3 ± 8,2	1,74 ± 0,2*	13,8 ± 0,7*	12,4 ± 0,9*
ГКП + ХТЗ-5	178 ± 4,1**, ##	2,4 ± 0,2#	13,5 ± 0,1	16,9 ± 1,5 **
Инкубация 30 мин				
Нормальная плазма + NaCl-30 (Контроль 4)	148,5 ± 4,6	2,36 ± 0,4	11,5 ± 0,2	15,8 ± 0,8
ГКП + NaCl-30	169,0 ± 5,4	1,62 ± 0,3*	13,5 ± 0,5#	11,7 ± 0,5*,#
ГКП + ХТЗ-30	185,3 ± 3,4*,#	3,7 ± 0,3*,##	8,7 ± 1,7**,##	15,9 ± 0,8**,##

Примечание: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 3 (нормальная плазма, инкубация 5 мин) или Контролем 4 (нормальная плазма, инкубация 30 мин) соответственно; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – различия статистически значимы между группами «ГКП + NaCl» и «ГКП + ХТЗ». ФХП – фактор XIII, ТВ – тромбиновое время, ГКП – гипокоагуляционная плазма, ХТЗ – хитозан.

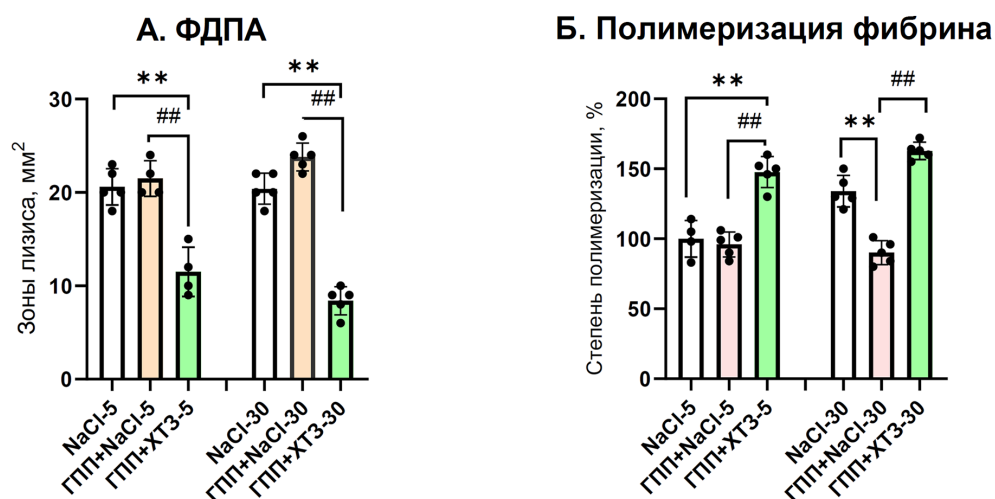


Рис. 3. Фибриндеполимеризационная активность и полимеризация фибрина в условиях *in vitro* при добавлении физиологического раствора или хитозана к ГПП с последующей инкубацией образцов в течение 5 мин (А) и 30 мин (Б).

Обозначения: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 3 (нормальная плазма, инкубация 5 мин) или Контролем 4 (нормальная плазма, инкубация 30 мин) соответственно; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – различия статистически значимы между группами «ГПП + NaCl» и «ГПП + ХТЗ». ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ПФ – полимеризация фибрина, ГПП – гипокоагуляционная плазма, ХТЗ – хитозан.

Обосновывая новизну полученных результатов, следует отметить, что многочисленные работы по хитозану свидетельствуют о необходимости изучения средств на его основе и их механизма действия.

В данном исследовании нами впервые изучены эффекты природного полисахарида хитозана на показатели системы гемостаза при добавлении к плазме со сниженной свертывающей способностью, условно названной в данном исследовании «гипокоагуляционная» и полученной после перорального введения крысам антиагреганта клопидогреля. Известно, что хитозан относится к кровоостанавливающим препаратам, свойства которого зависят от структуры, молекулярной массы, степени дезацетилирования и сульфатирования [13, 14]. Ранее в наших работах было показано, что прокоагулянтная активность хитозана возрастает при увеличении его концентрации [19]. В настоящей работе была выбрана концентрация хитозана, вызывающая максимальный коагуляционный эффект. Показано, что на фоне нарушений свертывания крови в сторону гипокоагуляции добавление хитозана к плазме приводит к обратному эффекту, а именно, повышению агрегационной функции тромбоцитов, полимеризации фибрина, концентрации фибриногена, снижению уровня фибринолиза (по данным ФДПА) и ТВ. Подобные эффекты наблюдали и другие исследователи, оценивая влияние хитина и хитозана на свертываемость крови и агрегацию тромбоцитов крови собак [26]. Хитозан при этом усиливал высвобождение производного от тромбоцитов фактора роста-AB (Platelet-derived growth factor AB, PDGF-AB) и трансформирующего фактора роста-β1 (Transforming growth factor β1, TGF-β1). По данным ряда исследователей хитозан и фибриноген могут образовывать ком-

плексы главным образом за счет электростатического притяжения, вследствие чего структура и конформация фибриногена изменяются под действием хитозана [16]. Кроме того, присутствие хитозана мало влияет на значения АЧТВ, но вызывает значительные нарушения в процессе свертывания крови, изменяя параметры тромбоэластограммы. На слабую временную активацию системы комплемента и отсутствие активации внутреннего пути свертывания (по параметрам АЧТВ) под действием хитозана сообщается и в других исследованиях [21]. В других исследованиях на модели терапевтически антикоагулированных (гепаринизированных) кроликов было изучено местное применение хитозана на язычные разрезы и показано сокращение времени внутриротового кровотечения. Авторы предполагают, что гемостатические эффекты хитозана были обусловлены его взаимодействием с эритроцитами, что приводило к их связыванию с образованием гемостатической пробки [27].

По современным представлениям свертывание крови является единым процессом, связанным с гемостатическими реакциями не только тромбоцитов, но и различных плазменных факторов. Однако именно тромбоциты играют важнейшую роль в начальном этапе остановки кровотечений. Это обусловлено тем, что, благодаря их сложному рецепторному аппарату, тромбоциты способны участвовать в активации не только первичного, но и вторичного (или плазменного) гемостаза, влияя на коагуляционные факторы плазмы крови, что и наблюдалось в нашем исследовании при действии хитозана. Механизм агрегационного процесса в значительной степени определяется присутствием на мембране тромбоцитов специализированных рецепторов, которые участвуют не-

посредственно в процессе их агрегации [28]. Клопидогрель подавляет агрегацию тромбоцитов, необратимо связываясь с пуриновыми рецепторами P2Y₁₂, что нарушает процесс активации и агрегации тромбоцитов и приводит к изменению взаимодействия фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами P_{1b}/P_{1a} [29]. Ранее в наших работах было показано, что хитозан обладает значительным агрегационным эффектом [30] и механизм его действия, вероятно, может быть связан с мобилизацией кальция и активацией рецепторов P_{1b}/P_{1a} на поверхности тромбоцитов [28]. По результатам настоящего исследования можно предположить, что хитозан вмешивается во взаимодействие тромбоцитов с факторами свертывания, в том числе, с фибриногеном и фибрином, с которыми он может образовывать комплексы за счет электростатического взаимодействия [16]. В результате этого структура и конформация фибриногена изменяются под действием хитозана, что в данных условиях позволяет организму вернуться к нормальному состоянию системы гемостаза [31, 32]. По мере развития знаний о физиологии свертывания крови и патофизиологии предлагаемые средства против кровоточивости продолжают совершенствоваться. Новые знания о гемостатических средствах в арсенале клиницистов помогают расширить возможности и границы оказания жизненно необходимой помощи. Дальнейшее развитие исследований по физиологии свертывания крови и понимание механизмов процесса кровотечений будет способствовать появлению безопасных и эффективных гемостатических средств [33].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shao H., Wu X., Xiao Y., Yang Y., Ma J., Zhou Y., Chen W., Qin S., Yang J., Wang R., Li H. Recent research advances on polysaccharide-, peptide-, and protein-based hemostatic materials: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2024;261(Pt. 1):129752.
2. Wang L., Hao F., Tian S., Dong H., Nie J., Ma G. Targeting polysaccharides such as chitosan, cellulose, alginate and starch for designing hemostatic dressings. *Carbohydr. Polym.* 2022;291:119574.
3. Gholap A., Rojekar S., Kapare H., Vishwakarma N., Raikwar S., Garkal A., Mehta T., Jadhav H., Prajapati M., Annapure U. Chitosan scaffolds: Expanding horizons in biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 2024;323:121394.
4. Kumar A., Vimal A., Kumar A. Why chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;91:615–622.
5. Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(2):487.
6. Naveed M., Phil L., Sohail M., Hasnat M., Baig M., Ihsan A., Shumzaid M., Kakar M., Khan T., Akabar M., Hussain M., Zhou Qi-Gang. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;129:827–843.
7. Wang C.-H., Cherg J.-H., Liu C.-C., Fang T.-J., Hong Z.-J., Chang S.-J., Fan G.-Y., Hsu S.-D. Procoagulant and antimicrobial effects of chitosan in wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(13):7067.
8. Zhao J., Qiu P., Wang Y., Wang Y., Zhou J., Zhang B., Zhang L., Gou D. Chitosan-based hydrogel wound dressing: From mechanism to applications, a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;244:125250.
9. Madurantakam P., Bowlin G., Moskowitz K.A. Woundstat™ topical hemostat reverses clotting diatheses in models of acquired and congenital hemophilia. *Blood.* 2008;112(11):2267.
10. Quade-Lyssy P., Ungerer C., Milanov P., Seifried E., Schüttrumpf J. Oral gene delivery of factor IX mutants formulated as chitosan nanoparticles for the treatment of hemophilia B. *Blood.* 2012;120(21):2048.
11. Misgav M., Lubetszki A., Brutman-Bazarini T., Martinowitz U., Kenet G. The hemostatic efficacy of chitosan-pads in hemodialysis patients with significant bleeding tendency. *J. Vasc. Access.* 2017; 18 (3):220–224.
12. Li X., Ji X., Chen K., Ullah M.W., Li B., Cao J., Xiao L., Xiao J., Yang G. Immobilized thrombin on X-ray radiopaque polyvinyl alcohol/chitosan embolic microspheres for precise localization and topical blood coagulation. *Bioact. Mater.* 2021; 6 (7):2105–2119.

Заключение

Таким образом, из полученных в настоящей работе результатов следует, что кровоостанавливающий препарат хитозана способен блокировать процессы деполимеризации фибрина, повышая уровень фибриногена и степень полимеризации фибрина. Отмечено, что влияние хитозана на первичный гемостаз, выражающийся в повышении агрегации тромбоцитов, приводит к блокаде явлений кровоточивости, вызываемой антиагрегантом клопидогрелем. При этом данный процесс довольно быстрый и начинается с первых минут. Следовательно, хитозан можно отнести к защитным агентам, повышающим или нормализующим свертывающий потенциал крови и устраняющим кровоточивость при геморрагических состояниях различного генеза.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова по фундаментальной теме № 121032300071-8 «Регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем организма в норме и при патологии». Все экспериментальные процедуры проведены в соответствии с международными биоэтическими нормами (Директива 2010/63/EU Европейского сообщества от 22.09.2010 г.) и с соблюдением этических норм работы с животными, установленными национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и биоэтическим комитетом учреждения (протокол № 2 от 04.06.2019 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

13. Камская В.Е. Хитозан: структура, свойства и использование. *Научн. обзор. Биол. науки*. 2016;6:36–42.
14. Wang W., Xue C., Mao X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020;164:4532–4546.
15. Huang Y., Zhang Y., Feng L., He L., Guo R., Xue W. Synthesis of N-alkylated chitosan and its interactions with blood. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018;46(3):544–550.
16. Zhang W., Zhong D., Liu Q., Zhang Y. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013;24(13):1549–1563.
17. Толстенков С.А., Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Банникова Г.Е. Биоспецифичный электрофорез комплексов между низкомолекулярными гепаринами и хитозанами. *Матер. Восьмой Межд. конф. М.: Изд-во ВНИРО*; 2006:253–256.
18. Guo X., Sun T., Zhong R., Ma L., You C., Tian M., Li H., Wang C. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1412.
19. Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е. Влияние полисахарида хитозана на плазменный гемостаз: исследование *in vitro*. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2022; (4):30–34.
20. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Исследование гемостатических свойств препарата на основе хитозана. *Биофарм. журнал*. 2022;14(1):3–7.
21. Benesch J., Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*. 2002;23(12):2561–2568.
22. Denzinger M., Hinkel H., Kurz J., Hierlemann T., Schlensak Ch., Wendel H.P., Krajewski S. Hemostatic property of chitosan: Opportunities and pitfalls. *Biomed. Mater. Eng.* 2016;27(4):353–364.
23. Izaguirre-Avila R., De la Peña-Díaz A., Barinagarrementeria-Aldatz F., González-Pacheco H., Ramírez-Gutiérrez A.E., Ruiz-Sandoval J.L., Quiroz-Martínez A., Cantú-Brito C. Effect of clopidogrel on platelet aggregation and plasma concentration of fibrinogen in subjects with cerebral or coronary atherosclerotic disease. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2002;8(2):169–177.
24. Kuszynski D., Lauver D. Pleiotropic effects of clopidogrel. *Purinergic Signal.* 2022; 18(3):253–265.
25. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. *Основы физиологии и биохимии свертывания крови*. М.: Изд-во Моск. ун-та; 2023. 159 с.
26. Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 2003;53(3):337–342.
27. Klokkevold P.R., Fukayama H., Sung E.C., Bertolami C.N. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1999; 57(1): 49–52.
28. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-изд-во; 2010. 832 с.
29. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. *Регуляторные пептиды как противотромботические агенты*. М.: Ким Л.А.; 2021. 108 с.
30. Lyapina L., Grigorjeva M., Lyapin G., Obergan T., Shubina T. Aggregation effects of chitosan in the blood. *NJD-iScience*. 2021;(61):13–16.
31. Бокарев И.Н. *Гематология для практического врача*. М.: Медицинское информ. агентство; 2018. 344 с.
32. Rodriguez-Merchan E.C. Local fibrin glue and chitosan-based dressings in haemophilia surgery. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2012;23(6):473–476.
33. Olabisi O.S., Nathan A.F. Topical coagulant agents. *Surg. Clin. North. Am.* 2022;102(1):65–83.

Поступила в редакцию 22.12.2023

После доработки 04.07.2025

Принята в печать 30.05.2025

RESEARCH ARTICLE

The corrective effect of chitosan on hemostasis parameters under hypocoagulation conditions caused by the antiplatelet agent clopidogrel

L.A. Lyapina , M.E. Grigorjeva , T.Y. Obergan* , T.A. Shubina 

Laboratory of Blood Protection Systems, Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: tobergan@mail.ru

The effect of chitosan *in vitro* on the blood plasma of healthy rats and rats with acquired bleeding caused by the use of the antiplatelet agent clopidogrel, which irreversibly inhibits P2Y₁₂ platelet receptors, was studied. It has been shown that the degree of procoagulant activity of chitosan does not depend on the incubation time (5 and 30 minutes at 37°C) when it is added to the blood plasma pool from healthy animals. However, there was a significant decrease (by 27%) in the fibrin-depolymerization activity of blood plasma, which is even more suppressed (by 42%) with an increase in incubation time. When chitosan was added to hypocoagulation plasma obtained after oral administration of the antiplatelet agent clopidogrel to rats (once, orally at a dose of 5 mg/kg) and incubation for 5 minutes, a pronounced activation of blood clotting was established. This was evidenced by increased values of fibrinogen concentration (by 38%), fibrin polymerization (by 51%) and platelet aggregation (by 32%), while significantly reducing fibrin

depolymerization activity of the blood (by 47%). With an extension of the incubation time of hypocoagulation plasma with chitosan, more pronounced effects of this drug were observed, which manifested itself in a significant increase in the concentration of fibrinogen, platelet aggregation, the degree of polymerization of fibrin and a decrease in thrombin time, characterizing the general pathway of blood coagulation. So, the hemostatic drug chitosan leads to a blockade of bleeding phenomena caused by clopidogrel used in the clinic, which was studied for the first time in this work.

Keywords: *platelet aggregation, hypocoagulation, clopidogrel, fibrin polymerization, hemostasis system, fibrin stabilizing factor, chitosan*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032300071-8.

Сведения об авторах

Ляпина Людмила Анисимовна – проф., докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: lyapinal@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Григорьева Марина Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: mgrigorjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0469-3943>

Оберган Тамара Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: tobergan@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Шубина Татьяна Александровна – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: shubina.74@mail; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0445-2066>