

УДК 612.115.3:615.273.52

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НОРМАЛЬНОЙ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ ХИТОЗАНОМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКОАГУЛЯЦИИ АСПИРИНОМ

© 2024 г. М. Е. Григорьева^{1, *}, Т. Ю. Оберган¹, Л. А. Ляпина¹, Т. А. Шубина¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

После доработки 06.05.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Проведено исследование изменения показателей свертывания крови в условиях *in vitro* при разном времени инкубации (5 мин и 30 мин) хитозана (ХТЗ) с нормальной и с гипокоагуляционной плазмой крыс. Добавление ХТЗ к плазме нормальных животных приводит к повышению ее прокоагулянтной активности независимо от длительности инкубации. Однако увеличение времени до 30 мин способствует более значительному снижению фибриндеполимеризационной активности крови. Инкубация ХТЗ с гипокоагуляционной плазмой, полученной после введения животным ацетилсалициловой кислоты (однократно, перорально в дозе 2 мг/кг), в течение как 5 мин, так и 30 мин приводит к активации свертываемости крови. В этих условиях удлинение времени инкубации вызывает более выраженные эффекты этого препарата: значительное повышение концентрации фибриногена, АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижение неферментативного фибринолиза. При этом большинство исследуемых показателей гемостаза приближаются к значениям, соответствующим нормальному уровню. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о высокой эффективности ХТЗ в качестве средства, восстанавливающего нормальную свертываемость крови и блокирующего явления кровоточности при гипокоагуляционных состояниях.

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

DOI: 10.31857/S0042132424040075, EDN: PPDZKQ

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших задач современной медицины — поиск новых путей, которые дают возможность контролировать и/или уменьшать кровотоечения различной этиологии. Непрерывный технологический прогресс в отрасли здравоохранения требует обновления подходов к созданию гемостатических средств. В последние годы наблюдается стремительный рост разработок биоматериалов с гемостатическими свойствами нового поколения, которые продолжают совершенствоваться по мере улучшения понимания физиологии и патофизиологии гемостаза (Pereira et al., 2018). Современные представления о процессах свертывания крови позволяют расширить потенциал способов получения безопасных, недорогих и легкодоступных гемостатиков, способных бороться с кровотоечениями (Sheppard, Foje, 2022).

Кровотечение — это неблагоприятное событие, возникающее при травмах, хирургических вмешательствах и кровотоочивости, которое может стать опасным для жизни. Более того, неконтролируемое кровотечение может осложнить хирургические вмешательства, изменяя исход этих манипуляций. Обычно при травме в месте повреждения активируются тромбоциты, которые вырабатывают фибрин и другие биологически активные вещества, запуская процессы свертывания крови, что приводит к образованию гемостатической пробки. Однако при неконтролируемом кровотечении формирование первичного тромбоцитарного тромба затруднено, поэтому в этом случае необходимо использовать эффективные гемостатические средства для обеспечения немедленного контроля кровотоочивости. Это позволит снизить риск осложнений и смертности в результате возникающих ге-

моррагий. С внутренним кровотечением можно эффективно бороться с помощью биологически активных веществ и антифибринолитиков. Однако их применение сопряжено с риском тромбозомболических осложнений, что обуславливает острую необходимость в постоянном поиске новых и совершенствовании уже имеющихся гемостатических средств (Malik et al., 2021). В настоящее время доступен широкий спектр гемостатиков, выбор которых во многом зависит от их доступности и безопасности, от интенсивности и причин возникновения кровотечения, а также от экономических факторов. К гемостатическим средствам относятся и биоматериалы на основе хитозана, которые демонстрируют антибактериальные, противогрибковые, кровоостанавливающие и обезболивающие свойства, в дополнение к их биосовместимости, биоразлагаемости и ранозаживляющему эффекту (Gheorghijă et al., 2023).

Хитозан (ХТЗ) — природный полисахарид, получаемый из различных источников, например хитина ракообразных. Установлено, что ХТЗ обладает умеренной свертывающей активностью (Cassano et al., 2017). ХТЗ и его производные с разной молекулярной массой и степенью деацетилирования отличаются по своим физико-химическим характеристикам, в определенных условиях, согласно мнению некоторых авторов, могут обладать свойствами поликаатионов и за счет электростатического взаимодействия с клетками крови способствовать их активации и агрегации (Neveleff et al., 2010). ХТЗ — многообещающее гемостатическое средство, он, как сообщается (Malik et al., 2021), усиливает гемостаз даже у пациентов с коагулопатией. В экспериментах *in vitro* и при пероральном введении ХТЗ здоровым животным доказана его способность вызывать усиление свертываемости крови за счет повышения агрегации тромбоцитов, снижения фибринолитического потенциала крови и возрастания степени полимеризации фибрина (Ляпина и др., 2022а; Шубина и др., 2022). В условиях моделирования гипокоагуляции, вызванной введением антикоагулянта гепарина, ХТЗ восстанавливает параметры свертывания крови (Ляпина и др., 2022б). Однако дальнейшее детальное изучение влияния ХТЗ на состояние системы гемостаза при патологическом снижении свертываемости крови разной этиологии остается актуальным.

Известно, что возрастанию риска геморрагических осложнений в организме может способствовать длительное и неконтролируемое применение повышенных доз не только антикоагулянтов, но и антиагрегантов. Хорошо известны эффекты в организме одного из наиболее распространен-

ных антиагрегантов — ацетилсалициловой кислоты (аспирина, АСК). Однако его роль в первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний остается спорной, а потенциальная польза ограничивается повышенным риском кровотечений (Zheng, Roddick, 2019; Murphy et al., 2021). Получены убедительные доказательства того, что в малых дозах этот препарат значительно снижает риски сосудистых событий: инфаркта миокарда — на 22%, инсульта — на 5%. Во вторичной профилактике этот препарат уменьшает риск повторных инфарктов и инсультов в еще большей степени (на 22–46%) за счет ингибирования тромбоксана A_2 (Capodanno, Angiolillo, 2016). Кроме того, аспирин применяется для лечения целого ряда симптомов, включая воспалительные заболевания, а также опухолевые процессы, и входит в группу нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Механизм его действия заключается в подавлении активности циклооксигеназ ЦОГ-1 и ЦОГ-2 — ферментов, регулирующих превращение арахидоновой кислоты в простагландины, простаглицлин и тромбоксан. В отличие от других НПВП при применении аспирина эти эффекты необратимы (Lichtenberger, Vijayan, 2019).

Цель настоящей работы — оценить влияние ХТЗ на свертывание крови в условиях *in vitro* при разной длительности инкубации с плазмой крыс в норме и при моделировании гипокоагуляции, вызванной пероральным введением антиагреганта аспирина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов в условиях *in vitro* использовано 20 половозрелых лабораторных белых крыс-самцов Wistar массой 250–280 г, полученных из питомника лабораторных животных “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Московская обл., Россия). Содержание животных и все экспериментальные процедуры соответствовали международным биоэтическим нормам (Директива 2010/63/EU Европейского сообщества от 22.09.2010) и этическим нормам работы с животными, установленными национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”.

В работе использован сублимированный водорастворимый ХТЗ (сукцинил хитозан) (Биопрогресс, Россия) и антиагрегант аспирин (АСК) (Hebei Jiheng Pharmaceutical Co., China), которые перед употреблением растворяли в 0.9%-ном растворе хлорида натрия (Мосфарм, Россия).

Дизайн исследования

В условиях *in vitro* проведено две серии экспериментов с использованием пула плазмы крыс.

В первой серии исследованы параметры гемостаза при добавлении ХТЗ к плазме, полученной от нормальных (здоровых) крыс. К образцам плазмы (0.1 мл) добавляли 0.05 мл раствора ХТЗ (5 мг/мл) или физиологического раствора, инкубировали при 37°C в течение 5 или 30 мин, а затем выполняли биохимические исследования. Использование 5- и 30-минутной инкубации ХТЗ с плазмой крови необходимо для того, чтобы выяснить: 1) степень влияния ХТЗ (усиление/ослабление/нейтральность) на параметры гемостаза и 2) оптимальный период инкубации ХТЗ с плазмой для проявления его прокоагулянтных эффектов.

В эксперименте использованы следующие группы: первая группа (Контроль 1) — нормальная плазма (НП) с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 5 мин; вторая группа (ХТЗ-5) — НП с добавлением ХТЗ, инкубация 5 мин; третья группа (Контроль 2) — НП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 30 мин; четвертая группа (ХТЗ-30) — НП с добавлением ХТЗ, инкубация 30 мин.

Во второй серии опытов использован пул гипокоагуляционной плазмы (ГПП). Моделирование состояния гипокоагуляции в крови крыс осуществляли пероральным введением АСК, снижающей агрегацию тромбоцитов (однократно в дозе 2 мг/кг массы тела животного). Через 20 мин после применения АСК производили забор крови. Далее к 0.1 мл полученной плазмы крови добавляли 0.05 мл или раствора ХТЗ в концентрации 5 мг/мл, или физиологического раствора, инкубировали при 37°C в течение 5 или 30 мин, а затем оценивали параметры гемостаза.

Использованы следующие экспериментальные группы: первая группа (Контроль 3) — НП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 5 мин; вторая группа (ГПП+NaCl-5) — гипокоагуляционная плазма (ГПП) с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 5 мин; третья группа (ГПП+ХТЗ-5) — ГПП с добавлением ХТЗ, инкубация 5 мин; четвертая группа (Контроль 4) — НП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 30 мин; пятая группа (ГПП+NaCl-30) — ГПП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 30 мин; шестая группа (ГПП+ХТЗ-30) — ГПП с добавлением ХТЗ, инкубация 30 мин.

Оценка состояния системы гемостаза

Образцы крови для определения показателей гемостаза получали из яремной вены

(*v. jugularis*) крыс, наркотизированных внутривенным введением 2%-ного раствора ксилазина (Alfasan International B.V., Netherlands) в количестве 0.2 мл/кг массы тела. В качестве консерванта использован 3.8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении кровь/консервант = 9:1. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, образцы крови центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, а для получения плазмы, бедной тромбоцитами, — при 2000 об/мин в течение 15 мин. После центрифугирования собирали пул плазмы, с которым работали, как описано выше.

Исследование всех параметров системы гемостаза проводили согласно стандартным коагулологическим методам (Ляпина и др., 2023). В плазме, обогащенной тромбоцитами, измеряли агрегацию тромбоцитов (АТ) по методу Борна на агрегометре АЛАТ-2 ЛА 220 (Биола, Россия) по инструкции к прибору с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ (в конечной концентрации 10^{-6} М). В бедной тромбоцитами плазме определяли активность фибринстабилизирующего фактора свертывания XIIIa (ФХIIIa), тромбиновое время (ТВ) и концентрацию фибриногена по Клаусу, используя стандартные наборы реактивов (Ренам, Технология-Стандарт, Россия) на анализаторе свертывания крови АСКА 2-02-Астра (Астра, Россия). Фибринолитическую активность определяли по тестам полимеризации фибрина (ПФ) и фибриндеполимеризационной (или неферментативной) фибринолитической активности (ФДПА) на пластинах нестабилизированного фибрина. После выполнения теста оценивали ФДПА по зонам лизиса на пластинах, а степень ПФ рассчитывали по формуле: $(L_k/L_0) \times 100\%$, где L_k — размер зоны лизиса после инкубации плазмы с физиологическим раствором (контроль), L_0 — размер зоны лизиса после инкубации плазмы с ХТЗ (опыт).

Статистическая обработка данных

По каждому методу исследования для всех экспериментов выполнено не менее трех повторов. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Анализ данных на нормальность распределения проверяли по тесту Шапиро—Уилка. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое M и стандартную ошибку среднего m . Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим парным сравнением выборок

с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов исследовали параметры гемостаза при добавлении ХТЗ к плазме крови нормальных крыс и дальнейшей инкубации опытных образцов в течение 5 или 30 мин. При этом установлено повышение свертываемости крови, по сравнению с контрольными показателями (добавление к пулу плазмы крови физиологического раствора), независимо от длительности инкубации. В группе ХТЗ-5 наблюдалось снижение ФДПА и ТВ на 27 и 18%, а также повышение ПФ, активности ФХШа и АТ на 30, 28 и 39% относительно Контроля 1. Увеличение времени инкубации до 30 мин (группа ХТЗ-30) также приводило к увеличению свертывания: ФДПА и ТВ уменьшались на 42 и 23%, а ПФ, активность ФХШа и АТ превышали значения группы Контроль 2 на 35, 13 и 25% соответственно. При этом не обнаружено достоверных изменений концентрации фибриногена при выбранных временных интервалах инкубации (табл. 1).

Таким образом, добавление ХТЗ к пулу НП приводит к усилению ее прокоагулянтной активности. Длительность инкубации не оказывает существенного влияния на способность ХТЗ повышать свертывание крови, вызывая, однако, более значительное снижение неферментативного фибринолиза (показатель ФДПА).

В следующей серии экспериментов изучали показатели гемостаза при добавлении ХТЗ к плазме крови при моделировании у крыс состояния гипокоагуляции, вызванной введением антиагреганта АСК. Как видно из табл. 2, пероральное введение АСК приводило к снижению свертывающего потенциала крови. В плазме крыс групп ГПП+NaCl-5 и ГПП+NaCl-30 отмечалось увеличение ФДПА на 25–29% и ТВ на 40–32%. При этом степень ПФ, концентрация фибриногена и АТ снижались на 25–38, 45–31 и 22–13% по сравнению с соответствующими значениями в Контроле 3 и Контроле 4.

При инкубации ГПП с ХТЗ в течение 5 мин (группа ГПП+ХТЗ-5) установлено снижение концентрации фибриногена на 36% и возрастание активности ФХШа на 29% относительно этих показателей в Контроле 3. При этом отмечается тенденция к уменьшению АТ и удлинению ТВ, тогда как ФДПА и степень ПФ соответствуют значениям в плазме нормальных животных (Контроль 3). При сравнении групп ГПП+ХТЗ-5 и ГПП+NaCl-5 практически по всем исследуемым параметрам выявлено достоверное усиление прокоагулянтных свойств крови после инкубации ГПП с ХТЗ: ФДПА и ТВ снижены на 24% в обоих случаях, а ПФ, активность ФХШа и АТ возрастают на 39, 11 и 19% соответственно (табл. 2).

Увеличение времени инкубации образцов ГПП с ХТЗ до 30 мин приводит к повышению концентрации фибриногена на 23% и АТ на 19% относительно Контроля 4. Сравнение групп

Таблица 1. Показатели гемостаза при добавлении к нормальной плазме крови крыс хитозана или физиологического раствора ($M \pm m$)

Условия опыта	ФДПА, мм ²	Полимеризация фибрина, %	ФХШа, ед./мл	Фибриноген, г/л	ТВ, с	АТ, %
Инкубация 5 мин						
Группа 1 (Контроль 1)	19.8 ± 0.7	100 ± 2.6	124.8 ± 5.6	3.7 ± 0.3	15.2 ± 0.5	100 ± 7.2
Группа 2 (ХТЗ-5)	14.5 ± 1.3**	130 ± 4.1**	159.2 ± 4.4**	3.6 ± 0.2	12.5 ± 0.8*	139 ± 9.0**
Инкубация 30 мин						
Группа 3 (Контроль 2)	20.9 ± 2.8	101 ± 4.2	152.1 ± 4.1	3.1 ± 0.3	19.6 ± 0.9	100 ± 6.3
Группа 4 (ХТЗ-30)	12.1 ± 0.9##	137 ± 5.6##	172.6 ± 5.1#	2.9 ± 0.2	15.1 ± 0.6##	125 ± 8.5#

Примечание: ** — $p < 0.01$, * — $p < 0.05$ — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 1 (инкубация 5 мин); ## — $p < 0.01$, # — $p < 0.05$ — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 2 (инкубация 30 мин). По каждому параметру выполнено не менее трех повторов.

Таблица 2. Показатели гемостаза при добавлении к гипокоагуляционной плазме крови крыс хитозана или физиологического раствора ($M \pm m$)

Условия опытов	ФДПА, мм ²	Полимеризация фибрина, %	ФХП, ед./мл	Фибриноген, г/л	ТВ, с	АТ, %
Инкубация 5 мин						
Группа 1 (Контроль 3)	20.0 ± 0.01	100 ± 0.01	127 ± 3.1	2.94 ± 0.15	19.0 ± 1.1	100 ± 4.6
Группа 2 (ГПП+NaCl-5)	25.0 ± 0.01*	75 ± 0.01	134.6 ± 5.4	1.62 ± 0.05**	26.7 ± 0.8**	78 ± 3.5*
Группа 3 (ГПП+ХТЗ-5)	19.0 ± 0.1 $p_{2-3} < 0.01$	104 ± 0.1 $p_{2-3} < 0.01$	164 ± 4.0 ** $p_{2-3} < 0.05$	1.87 ± 0.27*	20.3 ± 1.1 $p_{2-3} < 0.05$	93 ± 2.4*
Инкубация 30 мин						
Группа 4 (Контроль 4)	21 ± 1.6	105 ± 1.6	155.8 ± 2.3	3.0 ± 0.52	26.4 ± 2.2	100 ± 5.6
Группа 5 (ГПП+NaCl-30)	27 ± 0.9##	65 ± 0.9##	160 ± 7.5	2.06 ± 0.12##	25.1 ± 1.0##	87 ± 5.8
Группа 6 (ГПП+ХТЗ-30)	18.6 ± 0.05# $p_{5-6} < 0.01$	107 ± 0.05 $p_{5-6} < 0.01$	167 ± 5.9	3.60 ± 0.12# $p_{5-6} < 0.01$	22.2 ± 1.8	119 ± 6.5# $p_{5-6} < 0.05$

Примечание: ** — $p < 0.01$, * — $p < 0.05$ — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 3 (группа 1, инкубация 5 мин); ## — $p < 0.01$, # — $p < 0.05$ — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 4 (группа 4, инкубация 30 мин); p_{2-3} — значимость различий между группами 2 и 3; p_{5-6} — значимость различий между группами 5 и 6. По каждому параметру выполнено не менее трех повторов.

ГПП+NaCl-30 и ГПП+ХТЗ-30 показывает, что добавление ХТЗ к ГПП способствует усилению свертывающего потенциала крови: ФДПА и ТВ снижены на 23 и 12%, а степень ПФ, концентрация фибриногена и АТ достоверно увеличены на 64, 75 и 36% относительно соответствующих показателей в группе ГПП+NaCl-30 (табл. 2).

Итак, при добавлении ХТЗ к ГПП отмечается выраженная активация свертываемости крови, о чем свидетельствуют повышенные значения концентрации фибриногена, степени полимеризации фибрина и агрегации тромбоцитов при одновременном снижении тромбоинового времени и фибриндеполимеризационной активности крови. При удлинении времени инкубации гипокоагуляционной плазмы с ХТЗ наблюдаются более выраженные эффекты этого препарата, а именно: еще более значительное повышение концентрации фибриногена, агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижение неферментативного фибринолиза.

Таким образом, в настоящей работе проведено комплексное исследование изменения показателей системы гемостаза в условиях *in vitro* при разном времени инкубации ХТЗ как с нормальной, так и с гипокоагуляционной плазмой крыс. Для этого использованы нормальные здоровые

животные и создана модель гипокоагуляции, в которой снижение свертывания крови обусловлено пероральным введением антиагреганта АСК.

Как известно, на начальном этапе свертывания крови и, соответственно, остановки кровотечения немаловажную роль играют тромбоциты, запуская процессы как сосудисто-тромбоцитарного (первичного), так и плазменного (вторичного) гемостаза. Как утверждают многие исследователи, в месте повреждения сосуда в первую очередь активируются тромбоциты, которые благодаря наличию на их мембране специализированных рецепторов вырабатывают биологически активные вещества, которые принимают участие в процессе их агрегации (Кузник, 2010). В клинической практике для снижения агрегации тромбоцитов применяется достаточно большое количество препаратов, в том числе АСК — антиагрегант с хорошо изученным механизмом действия (Murphy et al., 2021), который использован в нашем исследовании для создания гипокоагуляционного эффекта. Аспирин широко применяется в первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, однако его использование может сопровождаться кровотечениями (Zheng, Roddick, 2019).

В наших экспериментах через 20 мин после однократного перорального введения АСК наблюдалось уменьшение свертывания крови: в плазме крыс установлено снижение АТ, степени ПФ и концентрации фибриногена, а также увеличение ФДПА и ТВ. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые утверждают, что аспирин может влиять на ацетилирование фибриногена, увеличивая проницаемость и стимулируя лизис сгустка, уменьшать образование тромбина и воздействовать на выработку фибрина (Undas et al., 2007). В дальнейшем добавление ХТЗ к ГПП, полученной после введения животным аспирина, приводит к усилению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, к повышению степени полимеризации фибрина и концентрации фибриногена, а также к снижению фибриндеполимеризационной (неферментативной фибринолитической) активности и тромбинового времени. Ранее нами проведено исследование по определению дозозависимости эффектов ХТЗ в экспериментах *in vitro*, в котором показано, что прокоагулянтная активность ХТЗ возрастает при увеличении его концентрации; также выявлены минимальная и оптимальная концентрации, обладающие заметным эффектом на свертывание крови (Шубина и др., 2022). В настоящей работе выбор концентрации исследуемого биополимера обусловлен одновременно возможностью проявления ХТЗ выраженного прокоагулянтного действия и отсутствием вероятности образования геля при соприкосновении с плазмой крови (Lee et al., 2024).

ХТЗ, являющийся природным линейным полисахаридом, проявляет в кислых средах поликатионные свойства, обладает антибактериальной, антиоксидантной, иммуномодулирующей активностью, а также используется при создании лекарственных форм с ранозаживляющими и кровоостанавливающими свойствами (Wang et al., 2020).

Один из механизмов гемостатического действия ХТЗ связан с адгезией, активацией и агрегацией тромбоцитов, концентрация которых повышается в месте повреждения сосудистой стенки в результате сорбции плазмы, что может быть обусловлено поверхностными свойствами молекулы полимера. Сорбция плазмы приводит также к увеличению количества эритроцитов и к их коагуляции в поврежденном месте. Результат этих процессов — формирование сетевой структуры псевдотромба из полимерных цепей ХТЗ и клеток крови (Забивалова, Юдин, 2021). Вероятно, механизм действия ХТЗ может быть связан также с мобилизацией ионов Ca^{2+} и их способностью индуцировать повышенную экспрес-

сию комплекса гликопротеина IIb/IIIa и пуриnergического рецептора $P2Y_{12}$ на поверхности мембран тромбоцитов, что ускоряет агрегацию тромбоцитов (Chou et al., 2003; Periyah et al., 2014). Кроме того, ХТЗ усиливает высвобождение тромбоцитами тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора роста β_1 . Возможный механизм прямой активации тромбоцитов связан с активацией тромбоцитарного Toll-подобного рецептора 2 (Lee et al., 2024). В работах других авторов сообщается о способности ХТЗ изменять проницаемость плазматической мембраны клеток (Киселевский и др., 2021).

В настоящей работе установлено, что добавление ХТЗ к пулу НП приводит к усилению ее прокоагулянтной активности, но длительность инкубации не оказывает значительного влияния на выраженность этого эффекта. Однако при добавлении ХТЗ к пулу ГПП увеличение времени инкубации до 30 мин вызывает более выраженные коагуляционные эффекты ХТЗ, а именно: повышение концентрации фибриногена, АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижение неферментативного фибринолиза. Итак, увеличение времени инкубации плазмы с ХТЗ приводит к более выраженному проявлению его прокоагулянтного действия за счет большего усиления активности свертывающих факторов крови. Необходимо также отметить, что независимо от времени инкубации ХТЗ с ГПП большинство исследуемых показателей гемостаза приближаются к контрольным (нормальным) значениям. Превышение некоторыми параметрами (концентрация фибриногена и АТ) нормальных значений не является критичным и в данных условиях (коррекция гипокоагуляции) может рассматриваться как положительный эффект.

Имеются данные, что дополнительным механизмом прокоагулянтного действия ХТЗ является контактное воздействие этого биополимера не только на клетки крови, но и на плазменные белки (Забивалова, Юдин, 2021). Некоторые авторы сообщают, что ХТЗ образует комплексы с фибриногеном и фибрином за счет электростатического взаимодействия (Zhang et al., 2013). В результате этого изменяются структура и конформация фибриногена, что приводит к усилению взаимодействия данного фактора свертывания с тромбоцитами и повышению их агрегационной активности (Rodriguez-Merchan, 2012). Результаты наших исследований позволяют предположить, что взаимодействие ХТЗ с плазменными белками влияет на конечный этап свертывания крови, а также на процес-

сы образования и лизиса фибриновых сгустков. Нами установлено усиление полимеризации фибрина за счет повышения активности фибринстабилизирующего фактора свертывания крови XIIIa, что, как мы полагаем, обусловлено усилением активности ключевого фермента каскада свертывания — тромбина. Это согласуется с данными других авторов (Актор et al., 2014), показавших, что у людей с гипокоагуляцией при применении содержащего ХТЗ препарата происходит активация факторов внешнего пути свертывания крови вследствие повышения активности тканевого фактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что в условиях *in vitro* инкубация хитозана с пулом нормальной плазмы приводит к повышению ее свертывающей способности. При этом длительность инкубации не оказывает существенного влияния на степень проявления прокоагулянтного действия хитозана. При инкубации биополимера с гипокоагуляционной плазмой, полученной после перорального введения крысам ацетилсалициловой кислоты, также наблюдается значительное усиление свертывающего потенциала крови, причем увеличение времени инкубации способствует более выраженному эффекту хитозана. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, что препарат хитозана способен блокировать процессы деполимеризации фибрина, повышая уровень фибриногена и степень полимеризации фибрина. Кроме того, биополимер влияет на первичный гемостаз, повышая агрегацию тромбоцитов, что приводит к блокаде явлений кровоточивости, вызываемой ацетилсалициловой кислотой. Следовательно, хитозан можно отнести к эффективным средствам, повышающим или восстанавливающим нормальную свертываемость крови при геморрагических и гипокоагуляционных состояниях.

Новые знания о гемостатических средствах, в том числе препаратах хитозана и средств на его основе, и понимание механизмов нормализации гемостаза в условиях пониженной свертываемости крови могут способствовать появлению новых безопасных и эффективных гемостатиков в арсенале клиницистов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Никаких

дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Забивалова Н.М., Юдин А.Б. Основные механизмы гемостатического действия хитозана // Прикладные вопросы военной медицины / Мат. Всерос. науч.-практ. конф. (Санкт-Петербург, 22–23 сентября 2021 г.). СПб.: ГНИИИВМ, 2021. С. 226–232.
- Киселевский Д.Б., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. и др. Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2021. Т. 76 (1). С. 18–23.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Исследование гемостатических свойств препарата на основе хитозана // Биофарм. журн. 2022а. Т. 14 (1). С. 3–7.
- Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А. Влияние хитозана на свертывание крови гепаринизированных крыс // Изв. РАН. Сер. биол. 2022б. № 6. С. 636–641.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. Основы физиологии и биохимии свертывания крови. М.: МГУ, 2023. 159 с.
- 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. С. 30–34.
- Актор S., Emekli-Alturfan E., Ozer C. et al. Effects of ankaferd blood stopper and celox on the tissue factor activities of warfarin-treated rats // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2014. V. 20 (1). P. 16–21.
- Capodanno D., Angiolillo D. Aspirin for primary cardiovascular risk prevention and beyond in diabetes mellitus // Circulation. 2016. V. 134 (20). P. 1579–1594.
- Cassano R., Di Gioia M.L., Mellace S. et al. Hemostatic gauze based on chitosan and hydroquinone: preparation, characterization and blood coagulation evaluation // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2017. V. 28 (12). P. 190–199.
- Gheorghijă D., Moldovan H., Robu A. et al. Chitosan-based biomaterials for hemostatic applications: a review of

- recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24 (13). P. 10540.
- Chou T.-C., Fu E., Wu C.-J., Yen J.-H.* Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 302 (3). P. 480–483.
- Lee V.K., Lee T., Ghosh A. et al.* An architecturally rational hemostat for rapid stopping of massive bleeding on anticoagulation therapy // *PNAS USA.* 2024. V. 121 (5). P. e2316170121.
- Lichtenberger L.M., Vijayan K.V.* Are platelets the primary target of aspirin's remarkable anticancer activity? // *Cancer Res.* 2019. V. 79 (15). P. 3820–3823.
- Malik A., Rehman F.U., Shah K.U. et al.* Hemostatic strategies for uncontrolled bleeding: a comprehensive update // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2021. V. 109. P. 1465–1477.
- Murphy E., Curneen J.M.G., McEvoy J.W.* Aspirin in the modern era of cardiovascular disease prevention // *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* 2021. V. 17 (4). P. 36–47.
- Neveff D.J., Kraiss L.W., Schulman C.S.* Implementing methods to improve perioperative hemostasis in the surgical and trauma setting // *AORN J.* 2010. V. 92 (5). P. S1–S15.
- Periyah M.H., Halim A.S., Yaacob N.S. et al.* Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 induction by oligochitosan accelerates platelet aggregation // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 653149.
- Pereira B.M., Bortoto J.B., Fraga G.P.* Topical hemostatic agents in surgery: review and prospects // *Rev. Col. Bras. Cir.* 2018. V. 45 (5). P. e1900.
- Rodriguez-Merchan E.C.* Local fibrin glue and chitosan-based dressings in haemophilia surgery // *Blood Coagul. Fibrinol.* 2012. V. 23 (6). P. 473–476.
- Sheppard O.O., Foje N.A.* Topical coagulant agents // *Surg. Clin. North Am.* 2022. V. 102 (1). P. 65–83.
- Undas A., Brummel-Ziedins K., Mann K.* Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions // *Blood.* 2007. V. 107. P. 2285–2292.
- Wang W., Xue C., Mao X.* Chitosan: structural modification, biological activity and application // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 4532–4546.
- Zhang W., Zhong D., Liu Q. et al.* Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013. V. 24 (13). P. 1549–1563.
- Zheng S.L., Roddick A.J.* Association of aspirin use for primary prevention with cardiovascular events and bleeding events: a systematic review and meta-analysis // *JAMA.* 2019. V. 321 (3). P. 277–287.

Restoration of Normal Blood Coagulation with Chitosan in the Simulation of Hypocoagulation with Aspirin

M. E. Grigorjeva^{a,*}, T. Y. Obergan^a, L. A. Lyapina^a, T. A. Shubina^a

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

The study of changes in blood clotting parameters under in vitro conditions with different incubation durations (5 min and 30 min) of chitosan with normal and with hypocoagulation plasma of rats was carried out. The addition of chitosan to the plasma of normal animals led to an increase in its procoagulant activity regardless of the duration of incubation. However, an increase in the incubation time to 30 min contributed to a more significant decrease in the fibrin-depolymerization activity of the blood. Incubation of chitosan with hypocoagulation plasma obtained after administration of acetylsalicylic acid (aspirin) to animals (once, orally at a dose of 2 mg / kg) for both 5 minutes and 30 minutes led to pronounced activation of blood clotting. Under these conditions, the lengthening of the incubation time caused more pronounced effects of this drug: a significant increase in the concentration of fibrinogen, ADP-dependent platelet aggregation, the degree of fibrin polymerization and a decrease in non-enzymatic fibrinolysis. At the same time, most of the studied hemostasis parameters approached values corresponding to the normal level. The results obtained in this work indicate the high effectiveness of chitosan as a means of restoring normal blood clotting, blocking the phenomena of bleeding in hypocoagulation conditions.

Keywords: acetylsalicylic acid, chitosan, fibrin stabilizing factor, fibrin polymerization, hemostasis system, hypocoagulation, platelet aggregation