

УДК 612.116.21+66.091

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТАТА ХИТОЗАНА, ПРИГОДНОГО ДЛЯ ОСТАНОВКИ ВНУТРИПОЛОСТНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ

© 2024 г. М. В. Волкова^{1, 2, *}, А. М. Носов³, К. П. Головкин³, В. А. Мацура¹,
К. Н. Демченко³, А. Я. Ковалевский³, Я. Б. Ковалевский¹

¹ООО Химическая компания “Орион”, Санкт-Петербург, 192148 Россия

²ФГАОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)”, Долгопрудный, 141701 Россия

³ФГБВОУ ВО “Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова”, Санкт-Петербург, 194044 Россия

*e-mail: biotech.volkova@list.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 06.06.2024 г.

Проведена сравнительная оценка показателей водопоглощения и гемостатической активности геля лактата хитозана *in vitro*. Получение соли хитозана подтверждено ИК-спектроскопией и термogravиметрическим анализом. Гемостатическая активность геля лактата хитозана подтверждена экспериментами *in vitro*. Осуществлена корреляция результатов, полученных *in vitro* с опубликованными ранее предварительными результатами по остановке внутриполостных кровотечений *in vivo*.

Ключевые слова: хитозан, гель, медицинское изделие, гемостатическая активность, первая помощь

DOI: 10.56304/S0234275824030098

В современном мире риск техногенных и природных катастроф, террористических атак и локальных столкновений остается высоким. Таким образом, неконтролируемое кровотечение, возникающее в результате травм и повреждений внутренних органов, по-прежнему остается основной причиной смерти. Своевременная остановка кровотечения является первым шагом в оказании медицинской помощи для спасения жизни и предотвращения развития осложнений [1, 2]. Особенно остро стоит проблема абдоминальных кровотечений, остановку которых осуществляют только при хирургическом вскрытии полости в условиях стационара. Опасность этого типа кровотечений заключается в том, что они могут длиться от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от времени догоспитального периода и транспортировки пострадавшего [3]. В случае продолжающегося кровотечения вероятность сохранения жизни и благоприятного исхода лечения напрямую зависит от сроков оказания медицинской помощи, — как можно более раннего и полноценного гемостаза.

Одним из способов остановки массивных внутриполостных кровотечений на догоспитальном этапе является применение пенополиуретанов, которые могут быстро расширяться и таким образом блокировать рану. Эти соединения обладают низкой водопоглощающей способностью, поэтому гемостаз достигается исключительно под действием создаваемого ими давления и коагуляционного каскада крови пациента [4]. Несмотря на эффективность этой технологии, использование пенополиуретанов может привести к осложнениям. Сильное давление на сосуды может нарушить работу сердца и кровоснабжение тканей [3]. Данных о других средствах для остановки внутрибрюшного кровотечения на этапе оказания первой помощи нами не обнаружено.

Разработано и зарегистрировано большое количество кровоостанавливающих материалов на основе хитозана, каолина, цеолитов и других. Преимущественно они представлены в сухом виде, например, в виде порошков, бинтов и губок и предназначены для кровоточащих конечностей или открытых ран [5, 6]. Применение этих препаратов на паренхиматозных органах требует хирургической операции, которая невозможна на этапе эвакуации [7]. При оказании первой помощи на догоспитальном этапе при брюшном кровотечении необходимо введение кровоостанавливающего средства путем простого вмешательства, например,

Список сокращений: ТГА — термogravиметрический анализ; МТТ — метилтиазолилдифенил-тетразолия бромид; FTIR — инфракрасная спектроскопия Фурье; OD — оптическая плотность.

через небольшой прокол брюшной полости после предварительной диагностики и при подозрении на наличие такого кровотечения. Ввиду того, что неизвестно точное место кровотечения, использование сухого продукта невозможно, так как он с высокой долей вероятности, не достигнет места кровотечения. На наш взгляд, наиболее перспективным для этих целей является кровоостанавливающий препарат в форме геля на основе хитозана. Преимуществами гемостатического геля является возможность его инъекционного введения, кроме того, он полностью заполняет глубокие и раны сложной формы [2]. При абдоминальном введении гелевая форма обеспечит равномерное распределение кровоостанавливающего средства и гарантирует достижение хитозаном места повреждения и остановку кровотечения.

Ранее были проведены исследования по безопасности и эффективности применения геля на основе хитозана для остановки внутриполостного кровотечения [8–10]. Цель данной статьи охарактеризовать этот гемостатический гель и связать его физико-химические и биохимические характеристики *in vitro* с результатами *in vivo*, опубликованными ранее.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

1. Синтез лактата хитозана

Порошок хитозана (молекулярная масса около 500 кДа, степень деацетилирования 90–92%, (Jinan Refine Chemical Co., Ltd., Китай) загружали в 80%-ный этанол, затем добавляли молочную кислоту в соотношении 1 : 1. Смесь нагревали до 40°C и при перемешивании выдерживали в течение 3 ч. Затем смесь охлаждали и фильтровали. Светло-желтый продукт промывали 80%-ным этанолом и сушили в вакуумном шкафу при 50°C.

2. Определение степени замещения

Степень замещения аминных групп в лактате хитозана оценивали титрованием избытка молочной кислоты, остающегося после реакции синтеза соли. Избыток молочной кислоты определяли в суммарном фильтрате при промывке готовой соли. В типовом эксперименте 1 г промывного раствора смешивали с 100 мл этанола и добавляли индикатор (фенолфталеин). Полученный раствор титровали стандартным раствором гидроксида калия до достижения точки эквивалентности, фиксируемой изменением цвета индикатора. По объему раствора КОН рассчитывали количество оставшейся после синтеза молочной кислоты. Затем рассчитывали степень замещения, исходя из молекулярной массы одного фрагмента хитозана и степени деацетилирования.

3. Водопоглощение

Порошок лактата хитозана массой 1 ± 0.05 г помещали в чашку Петри. Затем осторожно по каплям добавляли 100 мл воды и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Порошок без перемешивания набирает ограниченное количество воды и только через 8 ч формирует равномерный гель во всем объеме добавленной жидкости. После инкубации избыточный объем жидкости аккуратно удаляли, а чашку Петри с гелем взвешивали. Водопоглощение рассчитывали по формуле:

$$W \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(m_1 - m_0)}{m_0},$$

где m_0 – масса образца, m_1 – масса образца после инкубации с водой.

4. ИК-спектроскопия

Инфракрасные спектры регистрировали на приборе Irapinity-1 (Shimadzu, Япония) с преобразованием Фурье (FTIR). Образцы прессовали на KBr с массовым соотношением 1 : 80. Сканирования проводили от 400 до 4000 cm^{-1} .

2.6. Термогравиметрический анализ

Термогравиметрический анализ (ТГА) проводили на приборе DTG-60AH (Shimadzu, Япония). Образец порошка лактата хитозана сканировали от 0 до 500°C при скорости нагрева 5°C/мин в токе азота.

5. Цитотоксичность

Цитотоксичность порошка лактата хитозана оценивали с помощью МТТ-теста. Линию клеток NIH 3T3 (ATCC® CRL-1658TM, “Биолот”, Россия) культивировали в среде DMEM (Gibco®, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco®,) и раствор пенициллина и стрептомицина (“ПанЭко”, Россия). Клетки высевали в 96-луночный планшет в концентрации 5×10^3 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO_2 в инкубаторе S-Bt Smart BioTerm (Biosan, Латвия). Порошок лактата хитозана стерилизовали под ультрафиолетом, а затем растворяли в питательной среде в диапазоне концентраций от 0.3 до 5.0 мг/мл. Через сутки питательную среду клеток заменяли свежей (контрольной) или средой с растворенной солью хитозана. Клетки культивировали в течение 48 ч, затем во всех лунках среду заменяли на свежую среду с добавлением 0.5 мг/мл МТТ (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 4 ч при 37°C. Затем среду с МТТ удаляли и в каждую лунку добавляли по 200 мкл диметилсульфоксида (Servicebio Technology, Китай). Оптическую плотность растворов в каждой лунке определяли

при длине волны 560 нм с вычетом фонового поглощения при длине волны 650 нм с помощью планшетного спектрофотометра Clariostar Plus (BMG LABTECH, Германия). Оценку метаболической активности клеток рассчитывали по формуле:

$$R(\%) = \frac{OD_{\text{образец}}}{OD_{\text{контроль}}} \times 100,$$

где OD – оптическая плотность при длине волны 560–650 нм.

6. Тест на свертываемость цельной крови *in vitro*

Для экспериментов *in vitro* использовали свиную кровь. Работа с животными проводилась в соответствии с международными рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол от 23 ноября 2021 г. № 256).

Для эксперимента использовали цельную кровь свиньи, содержащую антикоагулянт (3.8% цитрат натрия : кровь 1 : 9). Перед добавлением активировали кровь 0.1 М хлорида кальция (1 : 10). К образцу порошка массой 20.0 ± 0.5 мг добавляли 0.3 мл активированной крови, инкубировали 3 или 10 мин при 37°C и перемешивании со скоростью 150 об/мин в шейкере-инкубаторе ES-20/80 (Biosan). Затем к суспензии осторожно добавляли 1.7 мл деионизированной воды. Жидкую фракцию собирали и разбавляли в два раза. В качестве контроля использовали активированную кровь без добавления гемостатика, которую инкубировали и разбавляли аналогичным образом. Поглощение растворов определяли при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра Clariostar Plus (BMG LABTECH). Расчеты проводили относительно образца крови, приготовленного аналогичным образом, но без инкубирования ($OD_{\text{кровь}}$). Поглощение эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$\Gamma(\%) = 100 - \frac{OD_{\text{образец}}}{OD_{\text{кровь}}} \times 100,$$

где OD – значение оптической плотности при 540 нм.

7. Теоретическая максимальная способность к адсорбции клеток крови

К навеске порошка массой 25.0 ± 2.0 мг ($m_{\text{образец}}$) добавляли 0.5 мл эритроцитарной массы. Инкубировали 10 мин при 37°C и перемешивании со скоростью 150 об/мин в шейкере-инкубаторе ES-20/80 (Biosan). К суспензии осторожно добавляли 8.5 мл деионизированной воды. Жидкую фракцию собирали и разбавляли в пять раз. Поглощение растворов определяли при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра Clariostar Plus. Рас-

четы производили относительно образца эритроцитарной массы, подготовленного тем же способом. Максимальную мощность рассчитывали по формуле:

$$V_{\text{эр.масса}} \left(\frac{ml}{g} \right) = \frac{\left(0.5 \times \frac{\Gamma}{100} \right)}{m_{\text{образец}} (g)},$$

где Γ – поглощение эритроцитов (см. п. 5).

8. Приготовление гелей

Порошок лактата хитозана стерилизовали излучением 17 кГр. Для получения 100 г 5%-ного геля навеску лактата хитозана массой 5 г помещали в колбу и добавляли 95 г дистиллированной воды при интенсивном перемешивании. Растворение проводили при комнатной температуре.

9. Вязкость и плотность геля

Вязкость геля определяли с помощью ротационного вискозиметра Viscolead ONE L (Fungilab, Испания) согласно инструкции производителя. Плотность геля определяли по стандартной методике с использованием набора ареометров.

10. Статистика

При оценке стерильности геля и в МТТ-тесте было не менее трех повторностей для экспериментального образца. Во всех экспериментах с кровью *in vitro* и оценкой водопоглощения было проведено пять измерений. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хитозан обладает хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью, антибактериальной активностью и гемостатическими свойствами [11]. Химическая модификация хитозана позволяет модулировать физико-химические характеристики, антибактериальные и клеточно-адгезивные свойства полученного материала [12]. Для приготовления геля необходимо водорастворимое производное хитозана. В частности, производные хитозана, такие как лактат, способны растворяться в воде, тогда как хитозан растворим только в 1%-ном растворе кислоты. На основе лактата хитозана разрабатываются различные препараты для заживления ран [13]. Однако нами обнаружено лишь несколько работ, посвященных его гемостатической активности [7, 13, 14]. Наши исследования дополняют информацию о возможности использования лактата хитозана в качестве кровоостанавливающего средства.

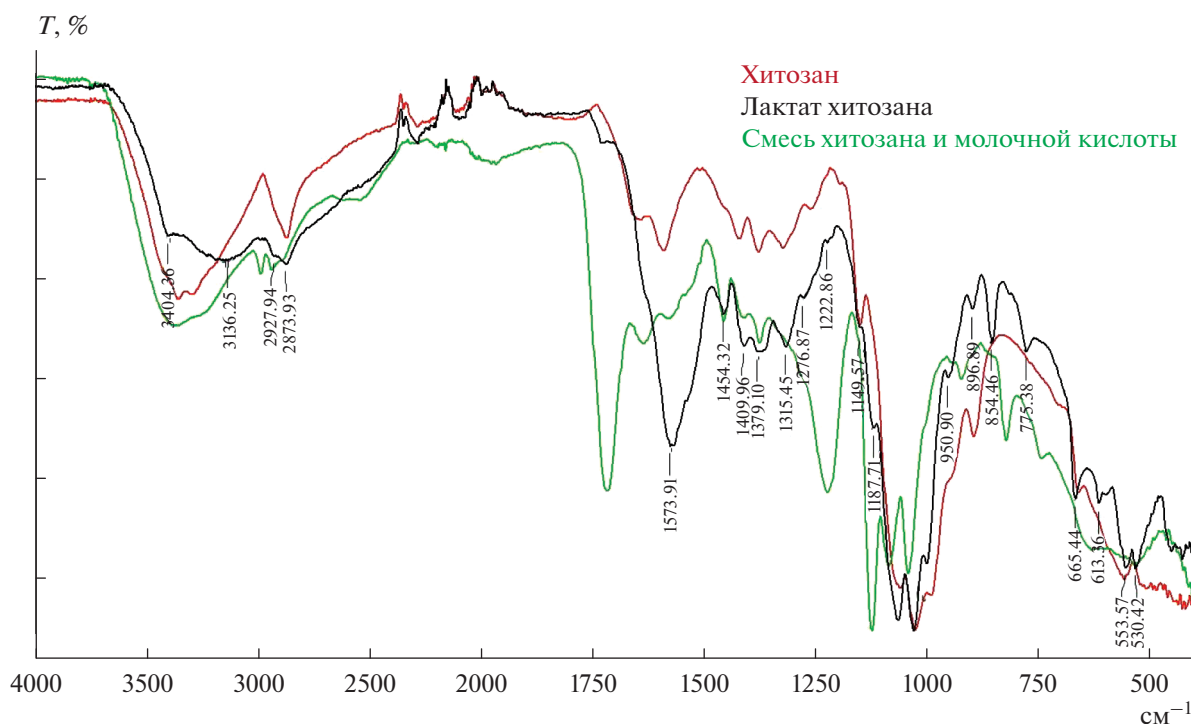


Рис. 1. ИК спектр исходного хитозана, синтезированной соли, а также механической смеси хитозана и молочной кислоты.
Fig. 1. IR spectra of the initial chitosan, the synthesized salt, and the mechanical mixture of chitosan and lactic acid.

В сухом виде этот материал представляет собой однородный мелкодисперсный порошок светло-бежевого цвета, который является основным компонентом геля. Степень замещения аминогрупп исходного хитозана составляет $83 \pm 5\%$. Порошок был охарактеризован в первую очередь, так как именно он обуславливает все характеристики применяемого медицинского препарата.

Характеристика водопоглощения *in vitro* коррелирует со способностью гемостатических изделий поглощать экссудат и концентрировать клетки крови для ускорения коагуляции. Поэтому медицинские средства для остановки кровотечений должны обладать хорошей водопоглощающей способностью [15]. По литературным данным, материалы, способные поглощать более 20 г на 1 г сухого вещества, обладают гемостатическими свойствами [16].

Оценка водопоглощающей способности показала, что 1 г порошка может абсорбировать 55 ± 2 г воды. Следовательно, лактат хитозана пригоден для абсорбции жидкости и концентрации клеток крови для достижения быстрого гемостаза [17].

В спектре исходного хитозана наблюдается несколько характерных пиков при 3360, 2919, 2874, 1640, 1592, 1375, 1153, 1061 и 893 cm^{-1} [18] (рис. 1).

Тест FTIR использовали для оценки функциональных групп, присутствующих в лактате хитозана. В спектрах лактата хитозана наблюдаются

широкие пики в диапазоне 3400–3200 cm^{-1} . Пики были отнесены к растяжению OH, что указывает на межмолекулярные водородные связи и валентные связи NH. Полосы поглощения около 2980 и 2883 cm^{-1} можно отнести к симметричному и асимметричному растяжению CH соответственно. Эти полосы характерны для полисахаридов и встречаются в спектрах других полисахаридов, таких как ксиланы [19], глюканы [20] и каррагинаны [21]. Наличие остаточных N-ацетильных групп подтверждено небольшими полосами при около 1660 cm^{-1} (C=O-растягивание амида) и 1317 cm^{-1} (C-N-растягивание амида) соответственно. Небольшая полоса при 1550 cm^{-1} , соответствует N-H-изгибу амида, а при 1570 cm^{-1} относится к протонированным аминогруппам соли хитозана [22]. Наличие большого количества протонированных аминогрупп четко видно на ИК-спектре полученного производного, что подтверждает получение соли хитозана.

Изгиб CH_2 и симметричные деформации CH_3 были подтверждены наличием полос около 1456 и 1379 cm^{-1} соответственно. Полосу поглощения при 1149 cm^{-1} можно отнести к асимметричному растяжению мостика C–O–C. Полосы 1066 и 1026 cm^{-1} соответствуют растяжению C–O. Этот сигнал при 1260 cm^{-1} был отнесен к деформационным колебаниям гидроксильных групп, присутствующих в хитозане [23]. Сигнал при 896 cm^{-1} соответствует выходу CH из плоскости кольца моносахаридов.

На рис. 2 представлена термограмма ТГА продукта, согласно которой у него две разные стадии потери веса. Потери массы на первой, начиная с 25 до 135°C, может соответствовать удалению адсорбированной воды (10%). Вторая стадия происходит в диапазоне 175–200°C за счет термического разложения продукта с потерей массы около 50%. Эти результаты демонстрируют более низкую термостабильность исследуемого лактата хитозана по сравнению с исходным хитозаном. По данным [24] первичная деградация чистого хитозана начинается при 247°C, и он полностью разлагается при температуре около 450°C с потерей массы около 54% [21]. Эти результаты согласуются с другими исследованиями [25] материалов на основе хитозана.

Для проверки токсичности лактата хитозана был выбран классический метод МТТ-теста с использованием фибробластов мыши 3Т3. Максимально возможная концентрация лактата хитозана в питательной среде обусловлена высокой степенью абсорбции воды порошком. При проведении эксперимента отмечено, что при добавлении соли хитозана в концентрации 5.0 мг/мл значительно возрастает вязкость питательной среды. Поэтому концентрации выше в исследовании не использовались. Тем не менее, инкубация клеток с питательной средой, содержащей лактат хитозана 2.5 мг/мл и менее, в течение двух суток не выявила токсического эффекта. Метаболическая активность клеток сохранялась на уровне 100%. Жизнеспособность клеток, которые были инкубированы с лактатом хитозана в концентрации 5.0 мг/мл, составила около 60%, что может быть обусловлено, в том числе, значительным снижением диффузии кислорода в питательную среду. Это свидетельствует об ограничении используемой методики для оценки цитотоксического действия водорастворимых производных хитозана и требует проведение дополнительных анализов другими методами.

По механизму коагуляции препараты на основе хитозана относят к пассивным кровоостанавливающим материалам. Основное действие заключается в извлечении жидкости из крови и адсорбции форменных элементов, таких как тромбоциты, эритроциты и т.д., посредством электростатических взаимодействий, что способствует достижению быстрого гемостаза [4]. Отсутствие зависимости от естественного механизма свертывания обеспечивает эффективность применения хитозана в качестве кровоостанавливающего средства даже при наличии в крови антикоагулянтов и при различных коагулопатических состояниях [26].

С целью оценки количественной характеристики разрабатываемого гемостатика, нами были апробированы несколько методов оценки взаимодействия материала с кровью. На первом этапе проверяли время образования сгустка при добавле-

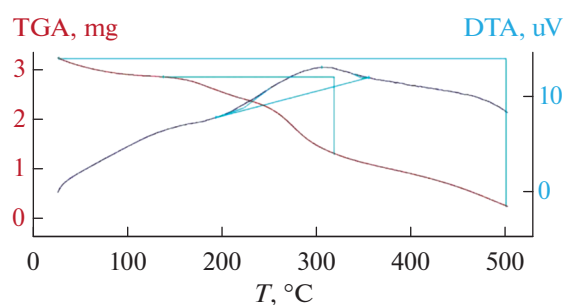


Рис. 2. Термическое поведение порошка лактата хитозана по данным термогравиметрического анализа.
Fig. 2. Thermal behavior of chitosan lactate powder by thermogravimetric analysis.

нии порошка лактата хитозана. В норме время свертывания крови составляет 5–10 мин, а эффективные гемостатические средства должны способствовать формированию сгустка не более, чем за 3 мин [27]. Учитывая это, для фиксации результатов экспериментов были выбраны временные точки 3 и 10 мин. Установлено, что поглощение эритроцитов порошком лактата хитозана через 3 и 10 мин составляет $95.3 \pm 0.4\%$ и $95.8 \pm 1.1\%$ соответственно. При этом для контрольных образцов крови без гемостатического средства эти показатели равны $4.0 \pm 0.9\%$ и $96.0 \pm 0.6\%$ соответственно. Таким образом, используемый лактат хитозана в виде порошка поглощает 95% эритроцитов уже в течение первых 3 мин и ускоряет образование тромба.

Нами предложен теоретический метод расчета гемостатической емкости водорастворимого производного хитозана. Для оценки поглощения использовали эритроциты, полученные из цельной крови после удаления плазмы для снижения эффекта сорбции жидкости. Установлено, что 1 г порошка лактата хитозана поглощает 16.2 ± 3.7 мл эритроцитарной массы. В цельной крови эритроциты составляют около 40%. Соответственно, 16 мл поглощенных эритроцитов эквивалентны примерно 40 мл цельной крови. Сопоставляя этот объем с полученной ранее величиной водопоглощения (55 ± 2 г воды на 1 г порошка), получаем, что она на 25% выше, чем теоретическая способность препарата адсорбировать клетки крови. Таким образом, данный материал пригоден для получения гелевой композиции, поскольку имеет запас водопоглощающей способности.

Плотный однородный гель для проведения экспериментов получали путем растворения соли в воде при интенсивном перемешивании. Полученный гель представляет собой прозрачную однородную субстанцию с вязкостью 5700 ± 300 сП и плотностью примерно соответствующей плотности воды (1.04 ± 0.05 г/см³). Гель с указанными характеристиками обладает текучестью и может быть легко введен с помощью шприца в брюшную полость.

Предварительные эксперименты по исследованию безопасности и эффективности применения геля лактата хитозана на экспериментальных моделях были представлены в ранних публикациях. В эксперименте на кроликах [8] при внутрибрюшном введении 5% геля лактата хитозана установлено отсутствие токсических эффектов на внутренние органы животных. Следовательно, умеренная цитотоксичность, определенная *in vitro*, с высокой долей вероятности, обусловлена именно изменением физического параметра.

Демонстрация эффективности разработанного гемостатического средства была проведена на специально разработанной модели [10]. Как правило, подобные исследования гемостатиков проводят на модели повреждения печени у животных после лапаротомии путем нанесения средства непосредственно на место травмы, например, как в публикации [6]. Наш эксперимент отличался тем, что после нанесения травмы, живот зашивали, а введение гемостатического геля осуществляли “вслепую”, а именно в проекцию печеночно-почечного и почечно-селезеночного пространства. Такая постановка эксперимента позволила оценить перспективы использования геля на основе хитозана в качестве средства первой помощи, когда осуществление лапаротомии и остановка внутрибрюшного кровотечения невозможна. При такой постановке исследования определено, что введение геля увеличивает выживаемость животных с 60 до 100%, а также повышает шансы полной остановки кровотечения с 33 до 100% [10].

Для проведения дальнейших работ по определению гемостатической эффективности геля хитозана в экспериментах *in vivo* необходимо было подробно исследовать его физико-химические свойства в системе *in vitro* с использованием эритроцитов крови животных.

Результаты проведенных исследований подтвердили высокую водопоглощающую способность (свыше 50 г/г сухого вещества) 5% гемостатического геля лактата хитозана, которая превышает гемостатическую емкость, не менее, чем на 20%. Таким образом, гель может быть использован для введения в брюшную полость с целью остановки внутреннего кровотечения без лапаротомии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ:

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по программе “Приоритет-2030”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen Y., Wu L., Li P., Hao X., Yang X., Xi G., Liu W., Feng Y., He H., Shi C. Polysaccharide based hemostatic strategy for ultrarapid hemostasis. *Macromol. Biosci.*, 2020, 20(4), 1900370. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900370>

2. Liu C., Liu C., Liu Z., Shi Z., Liu S., Wang X., Wang X., Huang F. Injectable thermogelling bioadhesive chitosan-based hydrogels for efficient hemostasis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, 224, 1091–1100. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.194>
3. Velmahos G. C., Spaniolas K., Duggan M., Alam H.B., Tabbara M., De Moya M., Vosburgh K. Abdominal insufflation for control of bleeding after severe splenic injury. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 2007, 63(2), 285–290. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3180d0a6ea>
4. Yang X., Liu W., Shi Y., Xi G., Wang M., Liang B., Feng Y., Ren X., Shi C. Peptide-immobilized starch/PEG sponge with rapid shape recovery and dual-function for both uncontrolled and noncompressible hemorrhage. *Acta Biomater.*, 2019, 99, 220–235. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.08.039>
5. Khan M.A., Mujahid M. A review on recent advances in chitosan-based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 124, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045>
6. Deineka V., Sulaieva O., Pernakov N., Radwan-Praglowska J., Janus L., Korniienko V., Husak Y., Yanovska A., Liubchak I., Yusupova A., Pgtkowski M., Zlatska A., Pogorielov M. Hemostatic performance and biocompatibility of chitosan-based agents in experimental parenchymal bleeding. *Mater. Sci. Eng. C.*, 2021, 120, 111740. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111740>
7. Jiang Y., Tang X., Li T., Ling J., Ge Y., Yang Y. Chitosan Lactate Particles for Non-Compression Hemostasis on Hepatic Resection. *Polymers*, 2023, 15(3), 656. <https://doi.org/10.3390/polym15030656>
8. Ковалевский А.Я., Носов А.М. Остановка продолжающегося внутрибрюшного кровотечения перспективными местными биосовместимыми гемостатическими средствами. *Известия Российской Военно-медицинской академии*. 2022, 41(2), 187–194. <https://doi.org/10.17816/rmmar104689>
9. Головки К.П., Самохвалов И.М., Гришин М.С., Носов А.М., Юдин А.Б., Ковалевский А.Я., Багненко А.С., Ковалишин И.М. Применение местного гемостатического средства на основе хитозана для контроля внутрибрюшного кровотечения. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2022, 24(1), 43–54. <https://doi.org/10.17816/brmma91155>
10. Головки К.П., Носов А.М., Юдин А.Б., Самохвалов И.М., Демченко К.Н., Пичугин А.А., Ковалевский А.Я. Местное гемостатическое средство в виде геля на основе хитозана — перспективная методика остановки продолжающегося внутрибрюшного кровотечения (экспериментальное исследование). *Вестник Российской Военно-медицинской академии*, 2024, 1, 61–70. <https://doi.org/10.17816/brmma562796>
11. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 2006, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1002/9781119450467>
12. Zhu Y., Zhang Y., Zhou Y. Application progress of modified chitosan and its composite biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(12), 6574. <https://doi.org/10.3390/ijms23126574>

13. Pieklarz K., Galita G., Tylman M., Maniukiewicz W., Kucharska E., Majsterek I., Modrzejewska Z. Physico-chemical properties and biocompatibility of thermo-sensitive chitosan lactate and chitosan chloride hydrogels developed for tissue engineering application. *J. Funct. Biomater.*, 2021, 12(2), 37. <https://doi.org/10.3390/JFB12020037>
14. Madni A., Khan R., Ikram M., Naz S.S., Khan T., Wahid F. Fabrication and characterization of chitosan–vitamin c–lactic acid composite membrane for potential skin tissue engineering, *Int. J. Pol. Sci.*, 2019, 2019(1), 4362395. <https://doi.org/10.1155/2019/4362395>
15. Zahedi P., Rezaeian I., Ranaei-Siadat S.O., Jafari S.H., Supaphol P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymer. Advan. Technol.*, 2010, 21(2), 77–95. <https://doi.org/10.1002/pat.1625>
16. Li B., Wang J., Gui Q., Yang H. Continuous production of uniform chitosan beads as hemostatic dressings by a facile flow injection method. *J. Mater. Chem. B.*, 2020, 8(35), 7941–7946. <https://doi.org/10.1039/D0TB01462A>
17. Wei X., Ding S., Liu S., Yang K., Cai J., Li F., Wang C., Lin S., Tian F. Polysaccharides-modified chitosan as improved and rapid hemostasis foam sponges. *Carbohydr. Polym.*, 2021, 264, 118028. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118028>
18. Domszy J.G., Roberts G.A.F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Die Makromolekulare Chemie: Macromol. Chem. Phys.*, 1985, 186(8), 1671–1677. <https://doi.org/10.1002/macp.1985.021860815>
19. Melo-Silveira R.F., Fidelis G.P., Costa M.S.S.P., Telles C.B.S.T., Dantas-Santos N., de Oliveira Elias S., Ribeiro V.B., Barth A.L., Macedo A.J., Leite A.L., Rocha H.A.O. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, 13(1), 409–426. <https://doi.org/10.3390/ijms13010409>
20. Wolkers W.F., Oliver A.E., Tablin F., Crowe J.H. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydr. Res.*, 2004, 339(6), 1077–1085. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.01.016>
21. Silva F.R.F., Dore C.M.P.G., Marques C.T., Nascimento M.S., Benevides N.M.B., Rocha H.A.O., Chavante S.F., Leite E.L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydr. Polym.*, 2010, 79(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.010>
22. Lim S.H., Hudson S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydr. Res.*, 2004, 339(2), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.024>
23. Song C., Yu H., Zhang M., Yang Y., Zhang G. Physico-chemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, 60, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.039>
24. Kumar S., Koh J. Physicochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 13(5), 6102–6116. <https://doi.org/10.3390/ijms13056102>
25. Tripathi A., Melo J.S. Preparation of a sponge-like bio-composite agarose–chitosan scaffold with primary hepatocytes for establishing an in vitro 3D liver tissue model. *RSC Advances*, 2015, 5(39), 30701–30710. <https://doi.org/10.1039/c5ra04153h>
26. Chou T.C., Fu E., Wu C.J., Yeh J.H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 302(3), 480–483. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00173-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00173-6)
27. Gustafson S.B., Fulkerson P., Bildfell R., Aguilera L., Hazzard T.M. Chitosan dressing provides hemostasis in swine femoral arterial injury model. *PHEM*, 2007, 11(2), 172–178. <https://doi.org/10.1080/10903120701205893>

Characteristics of Chitosan Lactate Suitable for Stopping Intracavitary Bleeding

M. V. Volkova^{a, b, #}, A. M. Nosov^c, K. P. Golovko^c, V. A. Matsura^a,
K. N. Demchenko^c, A. Ya. Kovalevsky^c, and Ya. B. Kovalevsky^a

^aChemical company “Orion”, St. Petersburg, 192148 Russia

^bMoscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia

^cMilitary Medical Academy named after C.M. Kirov, St. Petersburg, 194044 Russia

[#]e-mail: biotech.volkova@list.ru

Abstract—A comparative assessment of the water absorption and hemostatic activity of chitosan lactate gel *in vitro* was carried out. IR spectrophotometry and thermogravimetric analysis confirmed the production of chitosan salt. The hemostatic activity of chitosan lactate gel was confirmed by *in vitro* experiments. The results obtained *in vitro* were correlated with previously published preliminary results on stopping intracavitary bleeding *in vivo*.

Keywords: chitosan, gel, medical device, hemostatic activity, first aid