

© Коллектив авторов, 2024
УДК 616-001.4:616-005.1:541.64-089
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19054>
ISSN – 2073-8137

Влияние химической сшивки глутаровым альдегидом на сорбционные параметры раневых покрытий на основе хитозана

Д. И. Ушмаров¹, С. Е. Гуменюк¹, Т. Е. Григорьев^{2,3},
О. Ю. Шокель¹, Д. Р. Исянова⁴, П. И. Чумаков⁵

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Российская Федерация

⁴ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского (МОНИКИ), Российская Федерация

⁵ Ставропольский государственный медицинский университет, Российская Федерация

Effect of chemical crosslinking with glutaric aldehyde on sorption parameters of chitosan-based wound dressings

Ushmarov D. I.¹, Gumenyuk S. E.¹, Grigoriev T. E.^{2,3},
Shokel O. Yu.¹, Isyanova D. R.⁴, Chumakov P. I.⁵

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation

³ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Russian Federation

⁴ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Russian Federation

⁵ Stavropol State Medical University, Russian Federation

Проведено экспериментальное исследование *in vitro* и *in vivo* гемосорбционной способности нестабилизированных и стабилизированных путем химической сшивки глутаровым альдегидом образцов раневых покрытий на основе хитозана. Установлено, что несшитый хитозан проявлял максимальную сорбционную способность на ранних этапах нахождения в сорбционной среде (сорбционная емкость возрастала с 3-й по 5-ю минуту экспериментального времени лишь в 1,2 раза ($p < 0,05$)), достаточно быстро трансформируя свою губчатую структуру до структуры гидрогеля. Сшитый хитозан на протяжении всего экспериментального времени сохранял каркасные свойства и обладал выраженным пролонгированным сорбционным эффектом, который возрастал прямо пропорционально времени нахождения образца в сорбционной среде (сорбционная емкость с 3-й по 5-ю минуту экспериментального исследования возрастала в 5,4 раза ($p < 0,05$)). Отмечено, что сшитые образцы хитозана могут быть рекомендованы для лечения глубоких и обширных дефектов тканей, сопровождающихся выраженной экссудацией или активным кровотечением.

Ключевые слова: раневое покрытие, полимер, хитозан, глутаровый альдегид, сорбция, кровотечение

An experimental study was conducted *in vitro* and *in vivo* of the hemosorption capacity of non-stabilized and stabilized by chemical crosslinking with glutaraldehyde samples of wound dressings based on chitosan. It was found that non-crosslinked chitosan exhibited maximum sorption capacity at the early stages of being in the sorption medium (sorption capacity from 3 to 5 minutes of experimental time increased only 1.2 times ($p < 0.05$)), transforming its sponge configuration to the hydrogel structure rather quickly. Crosslinked chitosan retained its framework properties throughout the experimental time and had a pronounced prolonged sorption effect, which increased in direct proportion to the time the sample was in the sorption medium (sorption capacity from 3 to 5 minutes of experimental time increased 5.4 times ($p < 0.05$)). It was noted that crosslinked chitosan samples can be recommended for the treatment of deep and extensive tissue defects accompanied by pronounced exudation or active bleeding.

Keywords: wound dressing, polymer, chitosan, glutaric aldehyde, sorption, bleeding

Для цитирования: Ушмаров Д. И., Гуменюк С. Е., Григорьев Т. Е., Шокель О. Ю., Исыанова Д. Р., Чумаков П. И. Влияние химической сшивки глутаровым альдегидом на сорбционные параметры раневых покрытий на основе хитозана. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2024;19(3):243-246. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19054>

For citation: Ushmarov D. I., Gumenyuk S. E., Grigoriev T. E., Shokel O. Yu., Isyanova D. R., Chumakov P. I. Effect of chemical crosslinking with glutaric aldehyde on sorption parameters of chitosan-based wound dressings. *Medical News of North Caucasus*. 2024;19(3):243-246. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19054> (In Russ.)

Ch-S – Chitosan-Soft
Ch-S-GA – Chitosan-Soft- Glutaraldehyde

GA – глутаровый альдегид

Приоритетной задачей при оказании помощи пациентам с ранениями различного генеза является ранний подбор адекватного средства терапии, действие которого было бы ориентировано на превалирующее этиопатогенетическое звено. Для ран с обильной экссудацией или активным кровотечением важнейшей характеристикой раневого покрытия выступает его сорбционная, дренирующая и гемостатическая способность [1, 2].

Применение сорбционно активных материалов позволяет в наиболее ранние сроки создать в ране благоприятные условия для репарации путем качественного и своевременного очищения и дренирования раневой среды [3], оптимального адгезивного или компрессионного эффекта, адекватных сроков биodeградации образцов в тканях [4]. Помимо этого, такие материалы должны быть биосовместимы, гипоаллергенны, не должны вызывать местных воспалительных реакций и выраженных фиброзных изменений в раневой зоне. По данным современных исследований, одним из перспективных полимерных материалов с выраженным сорбционным эффектом является хитозан [5, 6].

Однако, как и большинство природных полимеров, хитозан обладает невысокими механическими характеристиками и сравнительно быстрой резорбцией в тканях. Чтобы получить стабильные образцы хитозана, необходима модификация его структуры путем проведения химической сшивки. Выбор сшивающего агента влияет на набухание материала, изменение модуля упругости материала, его химическую и механическую стабильность. Одним из популярных сшивающих агентов хитозана является глутаровый альдегид (GA) [7]. Альдегидные группы могут реагировать с функциональными аминогруппами хитозана, придавая ему устойчивость в различных биологических средах. При этом взаимодействии происходит химическое сшивание макромолекул полимера, повышение устойчивости материала к механическому воздействию, снижение степени его набухания при погружении в сорбционную среду, что является крайне важными параметрами для реализации пролонгированных эффектов хитозана.

Цель исследования – провести сравнительный анализ гемосорбционной способности раневых покрытий на основе сшитого и несшитого GA хитозана в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. Объектом исследования послужили два типа сорбционно активных губчатых раневых покрытий на основе хитозана (ChitoClear 43000-HQG 10, Primex, Siglufjordur, Iceland), несшитого и сшитого GA (Hubei Jinghong Chemical Co.LTD, China), обозначенные как Chitosan-Soft (Ch-S) и Chitosan-Soft-Glutaraldehyde (Ch-S-GA). Губчатые материалы были получены сублимационной сушкой 1 масс% раствора хитозана в 0,1 М водном растворе уксусной кислоты. Для сшивки в раствор добавляли GA для достижения массового соотношения GA/хитозан 1/100. Оба исследуемых образца об-

ладали высокой степенью пористости 99 %, поры в их ультраструктуре были однонаправленны и имели диаметр 70–200 мкм, толщину стенок 600–1200 нм. При проведении химической сшивки высокопористого хитозана Ch-S с GA, были получены образцы Ch-S-GA, отличающиеся выраженной механической прочностью, химической стабильностью, снижением степени набухания. При этом с улучшением каркасных и механических характеристик у этих образцов не были снижены параметры пористости и не была изменена исходная оптимальная пористая структура по сравнению с Ch-S.

На первом этапе исследования сорбционную активность образцов изучали *in vitro* путем их погружения в сорбционную среду стандартно заданного объема, для которой в качестве сорбтива использовали сыворотку крови. Для исследования сорбционной способности применяли методику динамического определения сорбционной емкости в соответствии с ГОСТ 3816–81. Оценку лабораторных параметров сорбции проводили путем контрольного взвешивания образцов до и после погружения в сорбционную среду.

Второй этап был представлен контролируемым экспериментальным исследованием *in vivo* с участием 120 особей породы Советская шиншилла массой 2800±150 г. Предварительно были сформированы две экспериментальные группы (n=60): животным 1-й группы вводили образцы Ch-S, животным 2-й группы – образцы Ch-S-GA. Каждая группа была разделена на 3 подгруппы (n=20) в зависимости от времени экспозиции образца в ране (3, 5, 10 минут). После проведения общей ингаляционной масочной анестезии изофлураном 2,5 об. % со скоростью потока 0,8 л/мин у животных обеспечивали доступ к печени путем выполнения верхней срединной лапаротомии, после чего печень выводили в рану и по оригинальной методике формировали ранение печени с дефектом паренхимы стандартного объема и формы, тем самым моделируя активное паренхиматозное кровотечение. Затем в созданный дефект вводили исследуемые образцы раневых покрытий и выдерживали экспозицию в ране 3, 5, 10 минут. В контрольные сроки по истечении времени экспозиции сорбционную способность образцов оценивали путем проведения контрольного взвешивания. При экстракции образцов из раны визуально оценивали выраженность каркасных свойств и величину деформации образца.

Статистический анализ данных проводили с помощью программ STATISTICA 6.1 (StatSoft, Inc., США) и Excel (Microsoft Office 2010, США). Статистическую значимость полученных данных определяли при помощи расчета критериев Шапиро – Уилка, U-критерия Манна – Уитни, критерия Стьюдента. Критерием уровня статистической значимости рассматривалось значение, равное $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Параметры сорбционной способности образцов *in vitro* по отношению к сыворотке крови представлены в таблице 1.

Таблица 1
Сорбционная емкость образцов по отношению к сыворотке крови в исследовании *in vitro*, см³

Образец	Экспозиция		
	3 мин	5 мин	10 мин
Ch-S	3,113±0,12**	4,214±0,012*	4,386±0,004**
Ch-S-GA	2,984±0,01**	5,931±0,016*	9,126±0,012**

Примечание. Критерий значимости отличий Стьюдента между группами соответствовал: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$.

Из представленных данных видно, что образцы Ch-S уже в первые минуты после погружения в сорбционную среду демонстрировали максимальную скорость сорбции, которая в дальнейшем снижалась по мере увеличения экспозиции. Так, в течение первых 3 минут скорость сорбции составляла в среднем $0,017 \pm 0,003$ см³ в секунду ($p < 0,001$), в течение последующих 2 минут – $0,009 \pm 0,001$ см³ в секунду ($p < 0,05$), в течение последующих 5 минут – менее $0,002 \pm 0,001$ см³ в секунду ($p < 0,001$). Кривая сорбции каркасными образцами хитозана Ch-S-GA несколько отличалась и свидетельствовала о нарастании сорбционной способности прямо пропорционально времени нахождения в сорбционной среде. В течение первых 3 минут скорость сорбции соответствовала значению $0,016 \pm 0,003$ см³ в секунду ($p < 0,05$), за следующие 2 минуты возрастала до $0,025 \pm 0,004$ см³ в секунду ($p < 0,05$) и в период с 5-й по 10-ю минуту экспериментального времени поддерживалась на высоком уровне – $0,022 \pm 0,003$ см³ в секунду ($p < 0,001$).

Такие особенности динамики сорбции могут быть трактованы влиянием GA на физико-химические параметры образцов. При глутаровой сшивке существенно повышается механическая прочность губок из хитозана, а их способность к набуханию и степень водопоглощения пропорционально снижаются. Это означает, что пролонгацию сорбционного эффекта образцов Ch-S-GA обеспечивает длительное сохранение минимальной толщины стенок в ультраструктуре хитозана и, как следствие, длительное поддержание максимального диаметра просвета пор. У образцов Ch-S, лишенных выраженной механической прочности, наиболее высокая сорбционная способность развивается сразу после контакта с сорбтивом, а затем прогрессивно снижается, так как вследствие выраженной пропитки и набухания стенок критически уплотняется структура материала, что приводит к уменьшению диаметра просвета пор и ограничению объема их наполнения жидкостью.

Результаты оценки гемосорбционной и гемостатической способности образцов в раневой среде *in vivo* (табл. 2) подтверждали предварительно полученные *in vitro* данные.

При погружении образцов в раневую среду с активным кровотечением Ch-S уже на начальных этапах развивали максимальную скорость сорбции. Образцам Ch-S-GA для осуществления максимальной эффективности сорбции требовалась стартовая капиллярная

пропитка, а потому они обладали несколько пролонгированным эффектом в ране и проявляли наибольшую сорбционную активность во второй контрольной точке. Стоит отметить, что в ранее проведенных авторами исследованиях по изучению свойств хитозана была доказана его природная гемостатическая способность [8], а потому к третьей контрольной точке в большинстве наблюдений в ране был достигнут окончательный гемостаз, в связи с чем скорость сорбции к 10-й минуте в исследовании *in vivo* резко снижалась.

Таблица 2
Сорбционная емкость образцов по отношению к цельной крови в условиях естественного гемостаза при ранении печени *in vivo*, см³

Образец	Экспозиция		
	3 мин	5 мин	10 мин
Ch-S	1,845±0,12*	2,002±0,016*	2,215±0,005**
Ch-S-GA	1,384±0,01*	7,426±0,014*	7,463±0,008**

Примечание. Критерий значимости отличий Стьюдента между группами соответствовал: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$.

На протяжении всего экспериментального времени проводили визуальную оценку степени деформации хитозана при контакте с сорбционной средой. При этом образцы Ch-S-GA демонстрировали выраженные каркасные свойства, полностью сохраняя стартовую конфигурацию во всех контрольных точках. При экстракции из раны Ch-S-GA не было отмечено ранней адгезии материала к тканям, однако за счет естественного увеличения в объеме без потери конфигурации такие образцы оказывали хорошее компрессионное действие на стенки раневой полости, тем самым потенцируя гемостатический эффект. Образцы Ch-S, напротив, значительно изменяли свою конфигурацию при нахождении в раневой среде и к третьей контрольной точке подвергались существенному ослизнению, по периферии приобретая структуру гидрогеля. Такая трансформация структуры обеспечивала проявление выраженных адгезивных свойств, что ограничивало применение таких образцов в качестве гемостатического средства при обширных и глубоких дефектах тканей. Динамика изменений конфигурации образцов при нахождении в раневой среде представлена на рисунке.

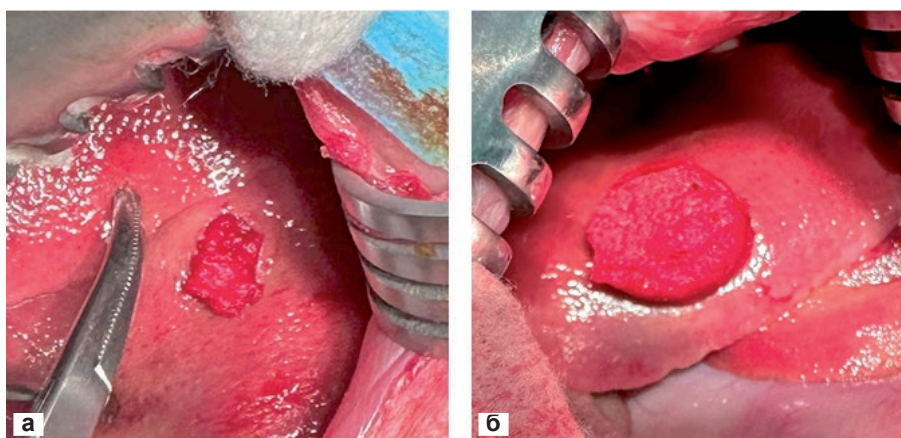


Рис. Динамика изменения конфигурации хитозана при нахождении в раневой среде на 10-й минуте: а) несшитый образец Ch-S – выраженные изменения стартовой конфигурации, начальные этапы трансформации структуры в гидрогель с наибольшей выраженностью по периферии; б) сшитый образец Ch-S-GA – демонстрация каркасных свойств, сохранение первоначального объема губчатого материала в ране, отсутствие значимых изменений конфигурации после осуществления сорбции

Заключение. Экспериментально была доказана высокая сорбционная активность сшитых и несшитых губчатых раневых покрытий на основе хитозана. Образцы Ch-S обладали высокопористой рыхлой структурой, за счет чего демонстрировали хорошую сорбционную способность на ранних этапах после погружения в сорбтив, которая затем снижалась прямо пропорционально времени нахождения в сорбционной среде. Такие образцы не обладали каркасными свойствами, сравнительно быстро трансформировали структуру до гелеобразной, обеспечивая тем самым выраженный адгезивный эффект в ране. Из этого следует, что Ch-S может быть успешно применен для лечения ранений малой площади и глубины, без тенденции к развитию массивного длительного кровотечения.

При химическом сшивании молекул хитозана GA удалось получить образцы раневых покрытий каркасного типа с пролонгированным сорбционным эффектом без снижения степени пористости структуры и изменения направленности пор. Такие образцы длительно сохраняли оптимальный диаметр сечения пор, обладали ограниченными параметрами смачивания материала, тем самым обеспечивая прогрессивное нарастание сорбционной активности по мере нахождения в сорбционной среде. Помимо этого, образцы сшитого хитозана Ch-S-GA отличались выраженной устойчивостью конфигурации при контакте

с сорбтивом, благодаря чему оказывали качественное компрессионное и гемостатическое действие в ране и могли бы быть рекомендованы для применения с целью лечения глубоких и обширных дефектов тканей, требующих более длительных сроков репарации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информированное согласие: Все экспериментальные процедуры с животными проводились с соблюдением правил гуманного обращения с животными: Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.), ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утвержден Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 1700-ст от 20 ноября 2014 г.) и иными нормативно-правовыми актами.

Финансирование: Исследование гемосорбционной способности раневых покрытий на основе сшитого и несшитого глутаровым альдегидом хитозана в экспериментах *in vitro* и *in vivo* выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/71. Химический синтез и характеристика пористых материалов были проведены в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература/References

1. Гаврилюк В. П., Липатов В. А., Михайлов К. А., Северинов Д. А. Оценка динамики показателей кровопотери при использовании новых образцов местных кровоостанавливающих средств после травмы печени в эксперименте *in vivo*. *Политравма*. 2022;(1):84-89. [Gavriilyuk V. P., Lipatov V. A., Mikhailov K. A., Severinov D. A. Evaluation of blood loss dynamics when using new samples of local styptic agents after liver injury in an *in vivo* experiment. *Polytrauma*. – *Polytrauma*. 2022;(1):84-89. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24412/1819-1495-2022-1-84-89>
2. Nair L. S., Laurencin C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 2007;32(8-9):762-798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
3. Han Y., Tao J., Khan A., Ali N., Malik S. [et al.]. Development of reusable chitosan-based sulfide nickel microspheres for more environmentally friendly and efficient bio-sorption decontamination of mercury toxicant. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.* 2023;30(16):47077-47089. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24563-8>
4. Singh R., Shitiz K., Singh A. Chitin and chitosan: biopolymers for wound management. *Int. Wound J.* 2017;14(6):1276-1289. <https://doi.org/10.1111/iwj.12797>
5. Гуменюк С. Е., Ушмаров Д. И., Шокель О. Ю., Гуменюк А. С., Матосян М. А. [и др.]. Применение раневых покрытий на основе хитозана при местном лечении ранений паренхиматозных органов: доклиническое экспериментальное исследование. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2023;30(6):41-55. [Gumenyuk S. E., Ushmarov D. I., Shokel O. Yu., Gumenyuk A. S., Matosyan M. A. [et al.]. Application of chitosan-based wound dressings in local treatment of parenchymal organ wounds: a preclinical experimental study. *Kubanskii nauchnii meditsinskii vestnik*. – *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2023;30(6):41-55. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-6-41-55>
6. Pellá M. C. G., Lima-Tenório M. K., Tenório-Neto E. T., Guilherme M. R., Muniz E. C., Rubira A. F. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 2018;196:233-245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>
7. Ушмаров Д. И., Гуменюк С. Е., Гуменюк А. С., Гайворонская Т. В., Караблина С. Я. [и др.]. Сравнительная оценка многофункциональных раневых покрытий на основе хитозана: многоэтапное рандомизированное контролируемое экспериментальное исследование. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2021;28(3):78-96. [Ushmarov D. I., Gumenyuk S. E., Gumenyuk A. S., Gayvoronskaya T. V., Karablina S. Ya. [et al.]. Comparative evaluation of chitosan-based multifunctional wound dressings: a multistage randomised controlled experimental trial. *Kubanskii nauchnii meditsinskii vestnik*. – *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2021;28(3):78-96. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2021-28-3-78-96>
8. Ushmarov D. I., Gumenyuk S. E., Gumenyuk A. S., Gayvoronskaya T. V., Grigoriev T. E. [et al.]. Preclinical trials for advanced chitosan-based coatings in treating purulent wounds. *Archiv EuroMedica*. 2021;11(2):63-71. <https://doi.org/10.35630/2199-885x/2021/11/2/16>

Поступила 02.05.2024

Сведения об авторах:

Ушмаров Денис Игоревич, ассистент кафедры хирургических болезней;
тел.: +79183334333; e-mail: uro@ksma.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3665-3906>

Гуменюк Сергей Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой;
тел.: +79181113111; e-mail: gse@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4197-2207>

Григорьев Тимофей Евгеньевич, заместитель руководителя по научной работе ККНБИКС-ПТ, НИЦ «Курчатовский институт», директор Физтех-школы КНТ МФТИ; тел.: +74991969284; e-mail: timgrigo@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8197-0188>
Шокель Ольга Юрьевна, студентка; тел.: +79298327315; e-mail: lsolga2108@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4793-783X>

Исянова Диана Ринатовна, ординатор кафедры лучевой диагностики;
тел.: +79180100643; e-mail: jidi-jidi@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0005-6321-3825>

Чумаков Пётр Ильич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой урологии;
тел.: +79054983128; e-mail: p-chumakov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6566-6087>