

УДК 612.115.3

## КОМПОЗИТ ХИТОЗАНА С АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2022 г. Л. А. Ляпина<sup>1</sup>, \*, М. Е. Григорьева<sup>1</sup>, Т. Ю. Оберган<sup>1</sup>, Т. А. Шубина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

\*e-mail: [lyapinal@mail.ru](mailto:lyapinal@mail.ru)

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 14.05.2022 г.

Принята к публикации 14.05.2022 г.

Созданы композиты хитозана с аспарагиновой кислотой при разных весовых соотношениях компонентов и изучено их влияние на состояние первичного и плазменного гемостаза в условиях *in vitro* с целью выявления наиболее перспективного из них. Эксперименты также проведены на здоровых животных при многократном в течение 14 сут ежедневном пероральном введении выявленного *in vitro* коагулянтного композита хитозан–аспарагиновая кислота в дозе 102 мкг/кг массы тела крыс. Установлено, что через 20 ч после последнего введения композита и его составных частей в эквивалентном количестве параметры первичного (уровень агрегации тромбоцитов) и плазменного (активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время, протромбиновое время, фибринолиз, уровень фактора XIIIa, концентрация фибриногена, процесс полимеризации фибрина) гемостаза свидетельствовали о повышении свертываемости крови и предупреждении геморрагических осложнений в организме крыс. Делается вывод о перспективности изучения хитозана и его композита с аспарагиновой кислотой в условиях патологически сниженной свертываемости крови с последующим их внедрением в клиническую практику.

**Ключевые слова:** хитозан, композит хитозан–аспарагиновая кислота, система гемостаза

**DOI:** 10.31857/S0042132422060059

### ВВЕДЕНИЕ

Применение фармакологических препаратов на основе аминокислот – общепринятая практика, используемая на протяжении последних десятилетий специалистами различных направлений. Известно, что аминокислоты выполняют роль нейромедиаторов, способствуют адекватной реализации функций макро- и микроэлементов, а также витаминов. Современные данные свидетельствуют о том, что биосинтез заменимых кислот в количествах, полностью обеспечивающих потребности организма, невозможен.

Одна из заменимых аминокислот – аспарагиновая кислота – синтезируется в организме из аспарагина. Она входит в состав животных и растительных белков, относится к эндогенным биоспецифическим соединениям, содержащимся в ЦНС, особенно в головном мозге, и не считается острой токсичной после перорального воздействия даже в большой дозе – 2 г/кг (Стручкова, Брилкина, 2016; Delaney et al., 2008). Аспарагиновая кислота обладает иммуномодулирующим действием – ускоряет процесс образования иммуноглобулинов и антител; участвует в синтезе ДНК и РНК – основных носителей генетической информации;

повышает физическую выносливость; нормализует баланс возбуждения и торможения в ЦНС. Она выполняет важнейшую роль в различных метаболических реакциях и способствует трансформации углеводов в глюкозу с последующим созданием запасов гликогена, в результате чего повышается сопротивляемость организма усталости (Лысыков, 2012). Аспарагиновая кислота входит в состав гемостатического гидрогеля, включающего полиаспарагиновую кислоту (polyaspartic acid, PASA) и дополнительно неорганический полифосфат и диальдегид. Этот гидрогель показал биосовместимость и адгезию к эндотелию тканей с высокими коагулянтными характеристиками. Так, на артерии уха кролика, используемой в качестве модели гемостаза *in vivo*, продемонстрировано, что гидрогель PASA может остановить кровотечение травматической раны и значительно уменьшить кровопотерю. В целом гидрогели PASA демонстрируют большой потенциал в биомедицинском применении, особенно в раневых перевязочных материалах и в восстановлении тканей (Chen et al., 2022).

Получены биоматериалы из биоактивных гемостатических средств, включающих не только аспарагиновую кислоту, но и хитозан. Они имеют отличные коагулянтные свойства при контакте с

кровью человека благодаря активации тромбоцитов, подтвержденной тестами на свертываемость крови и микрофотографиями, показавшими прилипание клеток крови к поверхности биоматериалов. Кроме того, эти биоматериалы биосовместимы с дермальными фибробластами человека и обладают превосходными антибактериальными свойствами при борьбе как с золотистым стафилококком *Staphylococcus aureus*, так и с кишечной палочкой *Escherichia coli*. Материалы на основе хитозана с гемостатическими свойствами обладают большим потенциалом при применении как в стерильных, так и в загрязненных условиях (Radwan-Pragłowska et al., 2019), поскольку известно, что замедленная коагуляция, хроническое воспаление, бактериальная инфекция и медленная пролиферация клеток препятствуют эффективному ранозаживлению.

Хитозан – это полисахарид, полученный из хитина, который обладает отличными ранозаживляющими свойствами, сочетающимися с антимикробной и гемостатической активностью. По сравнению с обычной марлевой повязкой, хитозановая повязка влияет на первичный (возрастание агрегации тромбоцитов) и плазменный гемостаз (ускорение протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени). Хитозановая повязка ингибирует рост бактерий до 8 дней после операции и является эффективным антимикробным и прокоагулянтным средством, способствуя заживлению ран и обеспечивая подходящую среду для полезной микробиоты (Wang et al., 2021). Хитозан – один из наиболее исследованных биополимеров, он активно применяется для ранозаживления благодаря своей биосовместимости, биоразлагаемости, нетоксичности и антимикробной активности. Кроме того, хитозан и его производные привлекают большое внимание из-за его легкой перерабатываемости в различные формы (гели, пены, мембраны и шарики) и способности доставки лекарств/генов к месту назначения. Все эти свойства делают материалы на основе хитозана особенно универсальными и перспективными в применении для раневых повязок (Moeini et al., 2020; Ilyas et al., 2022).

Хитозан, введенный *in vivo*, контактирует с кровью, взаимодействуя с ее компонентами, что имеет решающее значение для определения эффективности и безопасности полимера. Изучено влияние хитозана с различной молекулярной массой на структуру и функцию свертывающих белков. Показано, что хитозан и фибриноген могут образовывать комплексы главным образом за счет электростатического притяжения, в результате чего изменяется структура и конформация фибриногена (Луговской и др., 2013). Однако не выявлено значительного влияния хитозана на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). При этом изменения параметров тромбо-

эластограммы демонстрируют нарушение процесса свертывания крови. Эти результаты дают важное представление о молекулярной основе биологического ответа организма на хитозан и другие биополимеры (Zhang et al., 2013).

Олигосахарид хитозана (chitosan oligosaccharide, COS) известен своей уникальной биологической активностью: противоопухолевой, противовоспалительной, антиоксидантной, антибактериальной, иммуностимулирующей. Научный интерес к COS определяется возможностью его использования при производстве лекарств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и в тканевой инженерии. По сравнению с соответствующим полимером, COS имеет гораздо более высокие профили абсорбции на кишечном уровне, что обуславливает быстрый доступ к кровотоку и потенциальный контакт с компонентами крови. Он в определенной мере понижает риск гемолиза в зависимости от дозы и молекулярной массы, а необратимая агрегация тромбоцитов наблюдается при его высокой концентрации (Guo et al., 2018). Однако детальное влияние хитозана на компоненты крови до сих пор остается недостаточно ясным.

Цель настоящей работы – получить наиболее эффективный по коагулянтным свойствам композит хитозана с аспарагиновой кислотой, изучить его всестороннее влияние на систему гемостаза, включая первичный и плазменный гемостаз, а также выявить его роль в балансе фибринолиза и полимеризации фибрина в условиях *in vitro* и *in vivo* при пероральном многократном введении животным (крысам).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован хитозан водорастворимый (сукцинил хитозана), полученный по запатентованной методике из панцирей красноногих крабов в соответствии с ТУ 9284-027-11734126-08 (“Биопрогресс”, Россия), и аспарагиновая кислота отечественного производства. В опытах *in vitro* готовили композиты, включающие исходно 5000 мкг хитозана (ХТЗ) и 100 мкг аспарагиновой кислоты (АК) (композит 1), а далее готовили различные разведения композитов, а именно: композит 2 включал 1000 мкг ХТЗ + 20 мкг АК/мл, композит 3 – 100 мкг ХТЗ + 2 мкг АК/мл. ХТЗ и АК инкубировали при 37°C в течение не менее 2 мин.

В экспериментах, проведенных с соблюдением этических правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006), использовано 50 крыс-самцов Wistar массой тела 250–280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь – 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26°C, относительная влажность 50–70%). Для исследования

**Таблица 1.** Изменение показателей прокоагулянтной активности и фибринолиза при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан–аспарагиновая кислота или его составных частей

Условия опыта	АЧТВ, %	ТВ, %	ПВ, %	СФА, %	НФ, %
Композит 1	86 ± 7.0*	100 ± 0.3	71 ± 5.2**	64.5 ± 3.8**	72 ± 2.3**
Композит 2	87 ± 5.7*	100 ± 0.5	75 ± 4.4**	68 ± 3.0**	75 ± 3.2**
Композит 3	75 ± 2.7**	100 ± 0.5	81 ± 4.4*	70 ± 2.8**	72 ± 2.8**
АК 1	70 ± 3.6**	107 ± 0.5	86 ± 5.9	97 ± 4.1	81 ± 4.0**
АК 2	68 ± 3.0**	101 ± 0.5	93 ± 11.1	98 ± 4.0	91 ± 3.0
АК 3	78 ± 4.0*	100 ± 1.1	94 ± 6.7	98 ± 4.0	91 ± 3.5
ХТЗ 1	91 ± 4.2	94 ± 0.3	76 ± 2.7**	83 ± 4.0**	72 ± 3.7**
ХТЗ 2	90 ± 4.8	98 ± 0.3	77 ± 2.4**	81 ± 4.7**	72 ± 3.7**
ХТЗ 3	91 ± 5.0	95 ± 0.5	80 ± 2.9**	82 ± 5.9*	86 ± 4.1*
Контроль NaCl	100 ± 5.2	100 ± 0.3	100 ± 2.9	100 ± 3.1	100 ± 2.7

Примечание: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ ; статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с NaCl; здесь и в табл. 2, 3.

использовали здоровых животных. Животные были разделены на четыре группы: в течение 14 сут первой группе (Композит) перорально вводили ХТЗ + АК в ежедневной дозе 102 мкг/кг, второй группе (ХТЗ) подобным образом вводили эквивалентную дозу ХТЗ (100 мкг/кг), третьей группе – АК (2 мкг/кг), четвертой группе (Контроль) – 0.85%-ный раствор NaCl (физиологический раствор) в объеме 0.5 мл на крысу.

Взятие крови производили у животных из яремной вены (*vena jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3.8%-го цитрата натрия в соотношении 9 : 1 через 20 ч после 14-го введения исследуемых препаратов. Кровь центрифугировали дважды: сначала – в течение 5 мин при 1000 об./мин для получения богатой тромбоцитами плазмы, а затем – в течение 12 мин при 2500 об./мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

Исследовали суммарную фибринолитическую активность (СФА) и неферментативный фибринолиз (НФ), ферментативный фибринолиз (ФФ), степень полимеризации фибрина (фибринполимеризационную активность), АЧТВ, тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), концентрацию фибриногена, активность фактора XIIIa (ФХIIIa) в бедной тромбоцитами плазме крови, согласно стандартным методам. Свертываемость крови изучали по тесту АЧТВ, ТВ и ПВ на анализаторе свертывания крови АСКа 2-02-“Астра” (Россия). Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови определяли на агрегометре АЛАТ-2 220LA (“Биола”, Россия) по методу Борна с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации  $10^{-6}$  М (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012).

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., USA). Эмпирические распре-

деления проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Эксперименты in vitro*

Проведенное в условиях *in vitro* исследование влияния трех разных композитов ХТЗ–АС показало, что все три, а именно, композит 1 (5000 мкг ХТЗ + 100 мкг АС), композит 2 (1000 мкг ХТЗ + 20 мкг АК) и композит 3 (100 мкг ХТЗ + 2 мкг АК) обладали эффектом, активизирующим свертывание крови, за счет снижения АЧТВ на 13–25%, ПВ – на 19–29% и параметров фибринолиза: СФА – на 30–35.5%, НФ – на 25–28%. Композит 3, где использовались малые концентрации составляющих компонентов, также оказывал значительное воздействие на параметры гемостаза, снижая АЧТВ на 25%, ПВ – на 19%, СФА – на 30%, НФ – на 28%. Из составных частей композитов: ХТЗ значительно снижал фибринолиз крови (на 14–28%), а АК подавляла АЧТВ (на 22–32%), не влияя на другие параметры гемостаза (табл. 1).

Нами также установлено, что *in vitro* композиты эффективно усиливали активность ФХIIIa на 66–72% и полимеризацию фибрина – 30–42%, практически не изменяя концентрацию фибриногена и агрегацию тромбоцитов, по сравнению с контролем. Из составных частей только эквивалентная концентрация ХТЗ в композите 2 достоверно повышала концентрацию фибриногена на 16.6%. При этом ХТЗ в композите 1 достоверно усиливал полимеризацию фибрина и агрегацию тромбоцитов на 17 и 20% соответственно, по срав-

**Таблица 2.** Изменение показателей гемостаза при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан–аспарагиновая кислота или его составных частей

Условия опыта	Степень полимеризации фибрина, %	Агрегация тромбоцитов, %	Концентрация фибриногена, %	Активность ФХШа, %
Композит 1	135.5 ± 5.2**	113 ± 5.6*	116.6 ± 5.1*	172 ± 8.6**
Композит 2	142 ± 6.7**	93 ± 4.8	108 ± 2.8	166 ± 7.8**
Композит 3	130 ± 3.3**	93 ± 4.5	110 ± 3.0	166 ± 8.4**
АК 1	103 ± 1.9	80 ± 7.0	112.5 ± 3.1*	110 ± 6.5
АК 2	102 ± 1.9	87 ± 6.9	112.5 ± 2.8*	97 ± 4.8
АК 3	102 ± 1.8	87 ± 7.2	108 ± 3.3	103 ± 4.9
ХТЗ 1	117 ± 2.3**	120 ± 6.5**	100 ± 3.5	138 ± 7.4*
ХТЗ 2	109 ± 2.8	107 ± 5.7	116.6 ± 3.4**	131 ± 6.6*
ХТЗ 3	108 ± 2.8	93 ± 5.0	100 ± 4.2	110 ± 7.7*
Контроль NaCl	100 ± 3.0	100 ± 5.8	100 ± 4.5	100 ± 4.9

нению с контролем. Кроме того, ХТЗ в эквивалентных по отношению к соответствующим композициям концентрациях повышал активность ФХШа.

На основании проведенных в условиях *in vitro* экспериментов выявлено, что композит, включающий минимальное количество ХТЗ и АК (композиция 3), обладает способностью повышать свертывание крови по всем тестам, а именно: АЧТВ, ПВ, активность ФХШа, при одновременном снижении СФА и НФ и повышении полимеризации фибрина (табл. 2).

#### Эксперименты *in vivo*

С композитом 3 далее проводили эксперименты на здоровых крысах, которым длительное время (в течение 14 сут) его вводили безопасным способом (перорально).

В этих условиях через 20 ч после последнего 14-го введения композита 3 установлено блокирующее действие на фибринолитический процесс (СФА снизилась на 28%, НФ – на 16%, ФФ – на 49%). Кроме того, композит снижал ПВ и АЧТВ на 27 и 18% соответственно при одновременном повышении активности ФХШа и агрегации тромбоцитов на 60 и 23% соответственно, по сравнению с контролем, при практически неизменном ТВ. Обращает на себя внимания факт значительного снижения ФФ, что указывает на преимущественный вклад именно ФФ в подавление СФА, что требует дальнейшего детального исследования этого процесса. Следует отметить, что активность ФХШа резко усиливается, что свидетельствует о способности данного композита участвовать в активации полимеризации фибрина (табл. 3).

Из составных частей коагулянтного композита 3 только ХТЗ снижает АЧТВ на 24% и ПВ – на 20%, а также показатели фибринолиза: СФА и НФ – на 12%, ФФ – на 26%. При этом наблюдается достоверное повышение агрегации тромбоцитов в 2 раза.

АК в чистом виде имеет только тенденцию к повышению активности ФХШа на 11%.

Таким образом, анализируя полученные данные, необходимо отметить, что при исследовании гемостазиологических эффектов трех композиций, мы остановили свой выбор на композите 3, так как, во-первых, в нем содержались наименьшие концентрации веществ, вызывающих коагулянтные эффекты в кровотоке; во-вторых, он оказывал наиболее выраженное действие на АЧТВ, по сравнению с другими композициями. Механизм гемостатического действия композита обусловлен не только присутствием в нем коагулянта хитозана, но и способствующей свертыванию крови аспарагиновой кислоты. В то же время можно заключить, что обнаруженные нами прокоагулянтные эффекты обусловлены в основном действием самого композита, включающего хитозан и аспарагиновую кислоту в определенном соотношении. До сих пор остро стоит проблема борьбы с массивной кровопотерей, являющейся причиной многочисленной смертности от кровоизлияния, которое может произойти как в бытовых условиях, так и во время операции, а также в боевых условиях. Коммерчески доступных биоматериалов может быть недостаточно для борьбы с чрезмерным кровотечением, поэтому пытаются создать разработки новых высокоэффективных комплексных гемостатических агентов (Radwan-Pragłowska et al., 2019). Полученные в настоящем исследовании результаты по изучению созданных нами композиций хитозана с аспарагиновой кислотой показали наличие у них повышенных гемостатических свойств. Результаты ряда исследований (Chou et al., 2003) показали, что хитозан усиливает адгезию и агрегацию тромбоцитов: после начального (в течение 5 мин) и длительного (в течение 30 мин) контакта тромбоцитов с хитозаном адгезия тромбоцитов дозозависимо повышается. Аналогично, хитозан также дозозависимо увеличивает агрегацию тромбоцитов и количество внутри-

**Таблица 3.** Изменение показателей гемостаза в плазме крови через 20 ч после 14-кратного перорального введения здоровым крысам композита хитозан–аспарагиновая кислота или его составных частей

Показатели	Условия опыта			
	контроль NaCl	композит 102 мкг/кг	ХТЗ 100 мкг/кг	АК 2 мкг/кг
СФА, %	100 ± 3.8	72 ± 1.5**	88 ± 3.8*	91 ± 2.1
НФ, %	100 ± 5.5	84 ± 4.5*	88 ± 3.5*	93 ± 5.0
ФФ, %	100 ± 5.3	51 ± 3.8**	74 ± 7.6*	95 ± 3.8
ПВ, %	100 ± 6.5	73 ± 3.0**	80 ± 2.9**	98 ± 5.0
ТВ, %	100 ± 7.6	98 ± 0.8	92 ± 3.4	101 ± 3.5
АЧТВ, %	100 ± 6.4	82 ± 5.1*	76 ± 1.5**	85 ± 5.4*
АТ, %	100 ± 7.6	123 ± 6.7**	212 ± 7.5**	92 ± 7.2
ФХШа, %	100 ± 3.1	160 ± 7.3**	112 ± 3.5*	111 ± 3.2*

клеточного свободного  $Ca^{2+}$ . Кроме того, хитозан значительно усиливает экспрессию комплекса гликопротеина Пв/Ша тромбоцитов. По данным авторов, хитозан – эффективный индуктор адгезии и агрегации тромбоцитов. Механизмы его действия могут быть обусловлены как повышением уровня  $Ca^{2+}$ , мобилизацией и усилением экспрессии комплекса гликопротеина Пв/Ша на поверхностях мембран тромбоцитов (Кузник, 2010; Periyah et al., 2014), так и высвобождением факторов роста из активированных тромбоцитов (Shen et al., 2006). В настоящее время создаются перспективные композиционные материалы на основе хитозана для применения в качестве гемостатических и ранозаживляющих средств (Zhang et al., 2013; Nu et al., 2018).

В наших исследованиях в условиях *in vitro* повышение агрегации тромбоцитов установлено только при высоких концентрациях хитозана (более 5 мг/мл), то есть отмечается дозозависимость действия и самого хитозана, и включающих его композитов.

В условиях *in vivo* при многократном поступлении в организм хитозана и/или включающего его композита также показано усиление агрегационной активности крови в зависимости от используемых доз.

Впервые в нашей работе проведено комплексное исследование изменений показателей всех звеньев системы гемостаза, в том числе и плазменного, под влиянием не только хитозана, но и композитов хитозана с аспарагиновой кислотой. Установлено, что параметры плазменного гемостаза дозозависимо изменяются в сторону активации свертывания крови. Дополнительно к этому, преимущество созданных нами композитов является то, что их можно применять атравматичным безопасным способом для получения выраженного коагулянтного эффекта, что и было продемонстрировано в настоящей работе. Хотя хитозан также относится к гемостатическим агентам, но, по сравнению с исследуемыми нами компо-

зитами (особенно композитом, содержащим минимальное количество хитозана и аспарагиновой кислоты) его эффекты значительно ниже.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на потенциальные возможности препаратов на основе коагулянта хитозана влиять на гемостазиологический статус организма, особенно в условиях пониженной свертываемости крови с признаками геморрагии. Созданные нами композиты хитозана с аспарагиновой кислотой обладают комплексным действием на первичный и плазменный гемостаз. При многократном пероральном поступлении композитов хитозан–аспарагиновая кислота в организм выявлены максимальные свертывающие эффекты у композита с минимальным включением хитозана и аспарагиновой кислоты (композит 3). При этом показано наличие у него свертывающих, фибринстабилизирующих, тромбоцитарных, антифибринолитических эффектов и способности к полимеризации фибрина. Композиционный материал хитозан–аспарагиновая кислота заслуживает особого внимания, так как он безопасен при атравматичном способе применения. Он также способен оказать мягкий антигеморрагический эффект в случаях снижения свертываемости крови, подавления агрегации тромбоцитов или интенсификации фибринолиза. Несомненно, композиты на основе хитозана могут быть отнесены к перспективным средствам для восстановления показателей гемостаза в условиях пониженной свертываемости крови.

## 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

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 292 с.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
- Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наукова Думка, 2013. 230 с.
- Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека // Экспер. клин. гастроэнтерол. 2012. № 2. С. 88–105.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Стручкова И.В., Брилкина А.А. Аминокислоты. Учебно-методическое пособие. Н. Новгород: ННГУ, 2016. 32 с.
- Chen D., Liu X., Qi Y. et al. Poly(aspartic acid) based self-healing hydrogel with blood coagulation characteristic for rapid hemostasis and wound healing applications // Coll. Surf. B Biointerfaces. 2022. V. 214. P. 112430. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112430>
- Chou Tz.-C., Fu E., Wu C.-J., Yeh J.-H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 302. № 3. P. 480–483. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00173-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00173-6)
- Delaney B., Shen Z.A., Powley C.R. et al. Acute and repeated dose oral toxicity of N-acetyl-L-aspartic acid in Sprague-Dawley rats // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. № 6. P. 2023–2034. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.042>
- Guo X., Sun T., Zhong R. et al. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01412>
- Hu Z., Zhang D.Y., Lu S.T. et al. Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 8. P. 273. <https://doi.org/10.3390/md16080273>
- Piyas R.A., Aisyah H.A., Nordin A.H. et al. Natural-fiber-reinforced chitosan, chitosan blends and their nanocomposites for various advanced applications // Polymers. 2022. V. 14. № 5. Iss. 874. P. 1–36. <https://doi.org/10.3390/polym14050874>
- Moeini A., Pedram P., Makvandi P. et al. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: a review // Carbohydr. Polym. 2020. V. 233. P. 115839. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
- Periayah 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. <https://doi.org/10.1155/2014/653149>
- Radwan-Pragłowska J., Piątkowski M., Deineka V. et al. Chitosan-based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties-synthesis and characterization // Molecules. 2019. V. 24. № 14. P. 2629. <https://doi.org/10.3390/molecules24142629>
- Shen E.C., Chou T.C., Gau C.H. et al. Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible biomaterial for platelet-rich plasma preparation // Clin. Oral Implants Res. 2006. V. 17. № 5. P. 572–578. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01241.x>
- Wang C.H., Cherng J.H., Liu C.C. et al. Procoagulant and antimicrobial effects of chitosan in wound healing // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 13. P. 7067. <https://doi.org/10.3390/ijms22137067>
- 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. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.777229>

## Chitosan Composite with Aspartic Acid and Its Effect on Blood Coagulation *in vitro* and *in vivo*

L. A. Lyapina<sup>a</sup>, \*, M. E. Grigorjeva<sup>a</sup>, T. Y. Obergan<sup>a</sup>, and T. A. Shubina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Biology Department, Moscow, Russia

\*e-mail: lyapinal@mail.ru

Composites of chitosan with aspartic acid were created at different weight ratios of components and their effect on the state of primary and plasma hemostasis *in vitro* was studied in order to identify the most promising of them. Experiments were also carried out on healthy animals with repeated daily oral administration of the detected *in vitro* coagulant composite chitosan-aspartic acid at a dose of 102 mcg/kg of rat body weight for 14 days. It was found that 20 h after the last administration of the composite and its components in an equivalent amount, the parameters of primary (platelet aggregation level) and plasma (activated partial thromboplastin time, thrombin time, prothrombin time, fibrinolysis, factor XIIIa level, fibrinogen concentration, fibrin polymerization process) haemostasis indicated an increase in blood coagulation and prevention of hemorrhagic complications in the rats organism. The conclusion is made about the prospects of studying chitosan and its composite with aspartic acid in conditions of pathologically reduced blood coagulation with their subsequent introduction into clinical practice.

**Keywords:** chitosan, chitosan–aspartic acid composite, haemostasis system