



УДК 666.974.6:615.271

# КОМПОЗИЦИОННЫЕ АЭРОГЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ С ГЕМОСТАТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА И ХИТОЗАНА

© 2025 г. Н. А. Горшкова\*, #, О. С. Бровко\*, С. Л. Кашутин\*\*

\* Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова УрО РАН,

Россия, 163020 Архангельск, просп. Никольский, 20

\*\* Северный государственный медицинский университет, Россия, 163000 Архангельск, просп. Троицкий, 51

Поступила в редакцию 20.06.2025 г.

После доработки 12.07.2025 г.

Принята к публикации 14.07.2025 г.

В настоящее время во всем мире наблюдается высокий спрос на новые эффективные гемостатические материалы. Перспективны для этих целей – высокопористые органические аэрогели на основе полисахаридов морского происхождения, таких как альгинат натрия и хитозан, которые благодаря своей развитой структуре и природному происхождению обладают такими важными свойствами, как биосовместимость, биодеградируемость, нетоксичность, химическая инертность, волокнистость, механическая прочность и нерастворимость в воде. В настоящей работе на основе комплекса альгината и хитозана с введением активных добавок (магнетит и ватерит) были получены композиционные аэрогельные материалы, и изучены их потребительские свойства с целью оценки возможности применения в качестве гемостатических материалов. Показано, что разработанные материалы характеризуются развитой микро- и мезопористой структурой, обеспечивающей высокую влагопоглощающую способность по отношению к физиологическому раствору, моделирующему pH крови теплокровных животных. Значение предельной впитывающей способности составило 67 и 43 г/г для материала, содержащего ватерит и магнетит, соответственно, что связано с различиями в пористой структуре образцов. Результаты тестирования антимикробной активности материалов подтвердили возможность их использования для биомедицинских целей. Наиболее выражена антибактериальная активность материалов по отношению к грамположительным микроорганизмам *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, диаметры зон подавления роста которых достигали  $24 \pm 0.2$  и  $20 \pm 0.2$  мм. Проведенный сравнительный анализ гемостатической активности разработанных материалов в эксперименте *in vivo* показал, что материалы характеризуются высокой скоростью остановки кровотечений по сравнению с ватным тампоном: время свертывания крови в экспериментальной группе для материала, содержащего ватерит и магнетит, составило 32.6 и 49.6 с соответственно, что в 1.3–2 раза меньше, чем в контрольной группе. Выполненные исследования показали, что композиционные аэрогельные материалы на основе комплекса альгината натрия и хитозана с введением активных добавок (магнетит и ватерит) могут составить серьезную конкуренцию как на международном, так и на российском рынке гемостатических препаратов и медицинских изделий.

**Ключевые слова:** альгинат, кровостанавливающая способность, хитозан, аэрогель, гемостатический материал

**DOI:** 10.7868/S1998286025060125

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка и внедрение гемостатических материалов для местной остановки кровотечений – приоритетная задача современной фундаментальной и практической медицины. Несмотря на широкий спектр представленных на фармацев-

тическом рынке гемостатиков различного состава, механизма действия и лекарственной формы, существующие местные кровостанавливающие средства имеют определенные ограничения и недостатки, что обуславливает необходимость их дальнейшего исследования и усовершенствования. В связи с этим поиск новой перспективной основы

Сокращения: АЛ – альгинат; ХТ – хитозан; АГВ – аэрогель, содержащий ватерит; АГМ – аэрогель, содержащий магнетит.

# Автор для связи: (тел.: +7 (8182) 41-20-86; эл. почта: nat.gorshkova@mail.ru).

для создания эффективного гемостатического средства не теряет своей актуальности [1, 2].

Современные локальные аппликационные кровоостанавливающие материалы представлены довольно широким спектром препаратов в различных лекарственных формах, таких как пленки, губки, гидрогели, гранулы, порошки, волокна, спреи, а также тканые и нетканые материалы, создаваемые на их основе. Наибольшую востребованность среди них получили гемостатические губки, которые за счет капиллярно-пористой структуры способны впитывать объемы крови, многократно превышающие их собственную массу без значительного изменения объема. В результате впитывания жидкой фазы крови происходит концентрация высокомолекулярных факторов крови, что запускает естественный каскад тромбообразования и способствует быстрому достижению гемостаза. Преимуществом гемостатических губок также является наличие адгезивных свойств, благодаря которым полотно имплантата фиксируется к поверхности травмированного органа без дополнительного шовного материала и других средств [3].

В качестве прекурсоров для создания гемостатических губок используют преимущественно соединения белковой природы (коллаген, желатин, фибриноген, тромбин), полисахариды (целлюлоза, крахмал, хитозан, альгинат и их производные), а также их комбинации. В последние годы на отечественном рынке наблюдается активное внедрение коллагеновых губок как российского, так и зарубежного производства: Тромбокол (ООО “Лужский завод “БЕЛКОЗИН”, Россия), Коллост (ООО “Биофармхолдинг”, Россия), TachoComb (CORZA MEDICAL, Германия), Супрасорб С (Lohmann and Rauscher, Австрия), которые обладают высокой гемостатической активностью и обеспечивают эффективное лечение в условиях хирургической практики, травматологии и других областях медицины. Однако, несмотря на высокую эффективность, важно учитывать и потенциальные риски, связанные с их применением, включая аллергические реакции, индивидуальную непереносимость, обструкцию дыхательных путей и гипертермию, а также невозможность применения для остановки кровотечений из крупных сосудов и артериальных кровотечений, что подчеркивает необходимость разработки новых биоразлагаемых и гипоаллергенных гемостатических композиций

с репаративными свойствами, лишенных выше-приведенных недостатков [4, 5].

В связи с этим, значительный интерес для создания гемостатических материалов представляют полисахариды морского происхождения – альгинат (АЛ) и хитозан (ХТ), которые широко применяются в биомедицинских и фармацевтических целях, но их потенциал еще не полностью раскрыт [6]. АЛ – это извлекаемый из бурых водорослей анионный линейный полисахарид, состоящий из чередующихся остатков 1–4, связанных  $\alpha$ -L-гулуроновой и  $\beta$ -D-маннуроновой кислот [7]. ХТ – линейный катионный полисахарид, который получают частичным *N*-деацетилированием хитина, находящегося в экзоскелете ракообразных, насекомых и некоторых видов грибов. ХТ образует неразветвленную цепь  $\beta$ -1-4 соединенных 2-амино-2-дезокси-D-глюкозных остатков [8]. К основным свойствам этих морских полисахаридов, обеспечивающим их пригодность для применения в качестве кровоостанавливающих средств, относятся высокая способность к набуханию и адсорбции, ранозаживлению и регенерации новых тканей, отсутствие токсичности и анафилаксии, биосовместимость, биоразлагаемость и собственная бактерицидная активность. Наличие реакционноспособных функциональных групп в макромолекулах АЛ и ХТ позволяет довольно просто модифицировать их для конкретных биологических задач.

На основе сравнительных клинических исследований [9–11] показано, что существующие коммерческие гемостатические материалы на основе ХТ как отечественного, так и зарубежного производства, такие как Celox (Ore-Medix, США), Hem-Con (Tricel Biomedical Inc., США), Гемофлекс (Инмед, РФ), Hi-BAND (Полихит, РФ), ХИТОКОЛДА (Evers Group Rus, РФ), демонстрируют высокую эффективность в остановке кровотечений [12, 13]. Несмотря на значительное количество научных статей и патентов, посвященных разработке биорезорбируемых ранозаживляющих матриц на основе АЛ, в настоящее время нет зарегистрированных губчатых гемостатических материалов на его основе [14–17].

Ранее нами были получены композиционные аэрогельные материалы на основе интерполимерного комплекса АЛ/ХТ с включением активных добавок (магнетит и ватерит), характеризующиеся развитой пористой структурой, благо-

даря чему они имеют большой потенциал для создания на их основе различных медицинских изделий, в том числе раневых покрытий, гемостатических или сорбционных материалов, а также носителей активных лекарственных веществ с их последующим контролируемым высвобождением. Важно отметить, что аэрогели на основе природных полисахаридов обладают биодоступностью и биодеградируемостью, что обеспечивает безопасность создаваемых на их основе лекарственных форм [18–20].

Несмотря на значительное количество работ, в которых описаны возможные области применения аэрогелей в фармацевтике и медицине, данное направление остается малоизученным, поскольку имеется недостаточное количество теоретических и экспериментальных данных по исследованию многокомпонентных гемостатических композиций на основе биополимерных аэрогелей методами *in vitro* и *in vivo*, что обуславливает необходимость проведения подобных исследований.

Настоящая работа – продолжение исследований, направленных на разработку и изучение свойств новых кровеостанавливающих материалов в форме мягких волокнистых матриц аэрогельного типа на основе комплекса АЛ/ХТ, сочетающих необходимые физико-химические и биологические свойства. Ожидается, что гемостатическое действие этих материалов будет основано на нескольких составляющих: высокопористой структуре, биодеградирующей основе и наличии в составе биактивных полисахаридов и активных агентов (ватерит, магнетит), обладающих различными биологическими эффектами, в т. ч. антибактериальной, прокоагуляционной активностью и др. При этом комбинация нескольких полисахаридов и активных добавок в составе композиции позволит значительно расширить физико-химические и лечебные свойства гемостатических материалов за счет синергии влияния всех компонентов. Цель работы – сравнительное исследование гемостатической активности аэрогельных материалов на основе полисахаридного комплекса альгинат-хитозан, содержащих магнетит и ватерит.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе разработки любого аппликационного гемостатического материала первостепенной задачей выступает определение его эффективности и безопасности применения. Для этого

необходимо понимание того, насколько использование исследуемого образца достигает цели остановки кровотечения, т.е. какой объем крови способен сорбировать образец и какова скорость остановки кровотечения. Основой этих эффектов служат физико-механические характеристики изделия, среди которых следует особо выделить пористую структуру материала [21, 22]. Как правило, микро- и нанопористая структура гемостатиков обеспечивает высокую влагопоглощающую способность, что позволяет впитывать большое количество раневого экссудата, концентрировать клетки крови и ускорять свертывание, тем самым обеспечивая быстрый гемостаз. Кроме того, малый размер пор материала усиливает адсорбцию клеток крови для достижения синергетической коагуляции.

Известно, что наноморфология аэрогельных материалов, определяющая их потребительские свойства, зависит от условий формирования гидрогеля, при этом роль последующей сверхкритической сушки заключается в сохранении пористой структуры [23].

Наличие полярных групп ионного характера, а также гидрофобных участков макромолекул АЛ и ХТ способствует их совмещению в растворе без значительных энергетических затрат благодаря образованию межмолекулярных ионных, водородных связей и гидрофобных взаимодействий [24]. Ионные связи формируются между карбоксильными группами АЛ и аминогруппами ХТ и имеют кооперативный характер, что приводит к образованию интерполимерного комплекса в виде плотного осадка – гидрогеля. Введение частиц ватерита или магнетита в систему АЛ/ХТ приводит к структурированию гидрогеля в результате образования двойных полимерных сеток, первая из которых сформирована полиэлектролитными взаимодействиями полисахаридов, а вторая – хелатными взаимодействиями полисахаридов с соответствующими ионами  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ , источниками которых служат ватерит и магнетит, соответственно [25, 26]. Достоинством такого подхода становится высокая прочность гидрогеля, что обеспечивает способность противостоять механическим деформациям, в т.ч. усадке и растрескиванию в процессе сверхкритической сушки, и способствует формированию максимально высокоразвитой пористости материала. Кроме того, содержащиеся в матрице материала ионы металлов принимают

участие в сосудисто-тромбоцитарном и плазменно-коагуляционном гемостазе, а также обеспечивают как процесс формирования тромбоцитарного тромба, так и фибринового сгустка.

Сформированные композиционные гидрогели после предварительной последовательной замены дисперсионной среды органическим растворителем высушивали в среде сверхкритического диоксида углерода, что обеспечило сохранение их морфологии в процессе сушки без повреждений каркаса геля. В результате было получено два образца аэрогеля на основе комплекса АЛ/ХТ, содержащие магнетит или ватерит, обозначенные как АГМ и АГВ, соответственно.

Изображения микроструктуры исследуемых материалов, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, представленные на рис. 1, показали, что оба образца обладают схожей развитой морфологией, которая представляет собой трехмерную сеть переплетающихся фибрилл шириной 15–20 нм и длиной 50–80 нм, с большим количеством открытых пор и транспортных каналов различного размера, что потенциально будет способствовать вовлечению большей доли материала в процессы адсорбционного взаимодействия и, как следствие, росту сорбционных характеристик.

Параметры пористой структуры образцов исследованы методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота (табл. 1). Оба образца обладают развитой микро-мезопористой структурой: удельная поверхность материала при введении частиц ватерита (АГВ) составила  $400 \text{ м}^2/\text{г}$ , что в 1.3 раза выше, чем для образца с добавкой магнетита (АГМ). Аналогично значение общего объема пор АГВ в 1.5 раза превышало таковое для АГМ; вклад мезопор в общий объем пор составляет 87 и 94% для АГМ и АГВ, соответственно. В отличие от образца АГВ, в структуре которого преобладают мезопоры, в структуре АГМ наблюдается значительно больший объем микропор (до  $0.21 \text{ см}^3/\text{г}$ ), что, вероятно, связано с наличием у частиц маг-

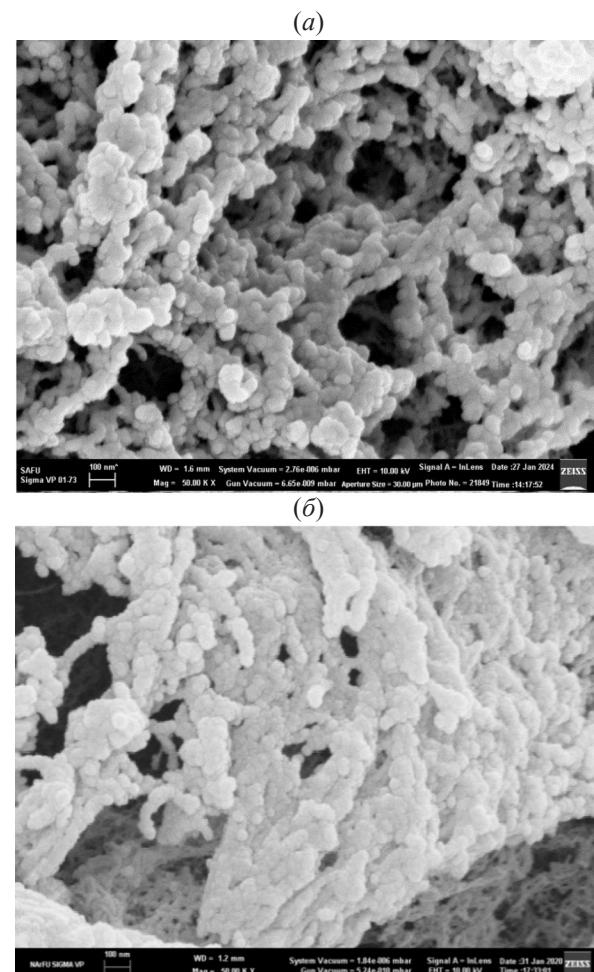


Рис. 1. Электронные микрофотографии материалов: (a) – АГМ, (b) – АГВ.

нетита собственной микропористой структуры. Статистически значимых различий у образцов по средней ширине как микро-, так и мезопор не обнаружено. Таким образом, природа активных добавок (магнетит и ватерит) оказывает влияние на параметры пористой структуры, что в свою очередь отражается на потребительских свойствах материалов, включая гемостатическую активность.

Таблица 1. Текстурные характеристики разработанных материалов

Образец	Удельная поверхность, $\text{м}^2/\text{г}$		Объем пор, $\text{см}^3/\text{г}$			Средняя ширина пор, нм	
	общая	мезопор	общий	микро-	мезо-	микро-	мезо-
АГМ	$307 \pm 11$	$293 \pm 9$	$1.30 \pm 0.10$	$0.21 \pm 0.02$	$1.14 \pm 0.11$	$1.17 \pm 0.14$	$16.3 \pm 1.9$
АГВ	$400 \pm 20$	$323 \pm 16$	$1.93 \pm 0.09$	$0.04 \pm 0.01$	$1.83 \pm 0.09$	$1.32 \pm 0.16$	$19.3 \pm 2.5$

Высокие значения удельной поверхности и значительное количество мезопор в образцах потенциально определяют высокую влагопоглощающую способность исследуемых материалов. Кроме того, развитая микро-мезопористая структура позволяет использовать аэрогельные материалы в качестве депо-матриц, в которых активное вещество находится в аморфном состоянии, что гарантирует его быстрое высвобождение и позволяет придавать дополнительные функциональные свойства гемостатического материала, в частности, добиваться полного купирования или значительного снижения болевого синдрома в раннем посттравматическом периоде, ускорять процесс свертывания крови и придавать материалу антибактериальные свойства [27, 28].

Один из основных критериев, которым должны соответствовать гемостатические материалы, – способность поглощать и удерживать влагу, а также стабильность во влажном состоянии, что способствует эффективному гемостазу и скорейшему ранозаживлению. Влагопоглощающую способность материалов оценивали по значению степени набухания ( $q$ , г/г). Результаты сравнительного исследования сорбционных свойств образцов АГМ и АГВ по отношению к физиологическому раствору (0.9 % NaCl), моделирующему pH крови теплокровных животных, представлены на рис. 2.

Согласно полученным результатам, при погружении обоих образцов во влажную среду сразу же начинается активное влагопоглощение, что представляет собой самопроизвольный физический (диффузионный) процесс, обусловленный развитой микро- и мезопористой структурой исследуемых материалов. Влагопоглощение материалов до установления равновесия в исследуемых системах протекает неравномерно, что подтверждается коэффициентом скорости этого процесса, рассчитанным в соответствии с уравнением (1) для разных моментов времени (рис. 3). При погружении обоих образцов в жидкую среду  $k$  достигает максимального значения – 5.3 и 4.5 мин<sup>-1</sup> для АГВ и АГМ, соответственно, затем скорость процесса влагопоглощения постепенно замедляется, и к третьей минуте эксперимента снижается в 28 и 38 раз для АГВ и АГМ, соответственно, после чего плавно выходит на плато, и к десятой минуте эксперимента достигается точка минимума функции.

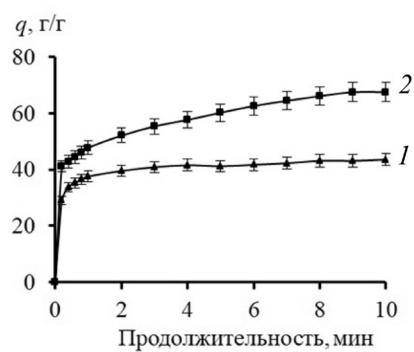


Рис. 2. Кинетические кривые влагопоглощения материалов: 1 – АГМ, 2 – АГВ.

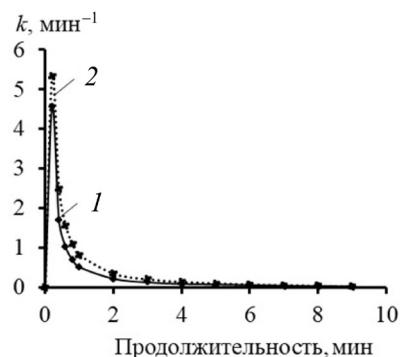


Рис. 3. Динамика коэффициента скорости влагопоглощения ( $k$ ) материалов: 1 – АГМ, 2 – АГВ.

Значение предельной впитывающей способности АГВ в 1.5 раза выше, чем у АГМ, и составляет 67 г/г, что связано с различиями в пористой структуре образцов. Кинетические кривые влагопоглощения образцов (рис. 2) имеют вид, характерный для ограниченно набухающих полимеров, что свидетельствует о том, что самопроизвольного растворения полимерной матрицы не происходит, и материал сохраняет целостность и формуустойчивость на протяжении всего эксперимента.

Любое скопление крови вне сосуда представляет собой хорошую питательную среду для микроорганизмов, что может привести к образованию гнойного процесса [29]. В связи с этим представляло интерес изучение антибактериальных свойств материалов относительно наиболее распространенных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, которые обитают повсеместно: *S. aureus* находят на коже, в носу и горле людей и животных; *E. coli* обитает в кишечнике людей и живот-

ных; а *B. subtilis* обычно встречается в воде, почве, растительности и на больничном оборудовании. При попадании патогенных микроорганизмов на открытую рану происходит ее инфицирование, что приводит к более медленному заживлению, повреждению кожи и другим осложнениям, включая диссеминированные инфекции или даже ампутацию, а наличие кровотока может способствовать переносу бактерий в другие места и дальнейшему распространению инфекции [30].

Изучение антимикробных свойств исследуемых материалов проводилось диско-диффузионным методом в отношении стандартных музейных штаммов двух грамположительных *B. subtilis* и *S. aureus* – и двух грамотрицательных микроорганизмов – *E. coli* и *P. mirabilis*. При интерпретации результатов условно было принято, что диаметр подавления роста микроорганизмов свыше 15 мм соответствует высокой активности, 10–15 мм – средней активности, 6–10 мм – низкой активности. Результаты тестирования антимикробной активности исследуемых материалов, представленные на рис. 4, показали, что оба материала обладают высоким ингибирующим действием в отношении всех исследуемых штаммов микроорганизмов.

Наиболее выражена антибактериальная активность материалов по отношению к грамположительным микроорганизмам *S. aureus* и *B. subtilis*, диаметры зон подавления роста которых достигали  $24 \pm 0.2$  и  $20 \pm 0.2$  мм, соответственно, и значимо не отличались между собой для обоих образцов ( $p < 0.05$ ). При исследовании активности

в отношении *E. coli* диаметр зоны подавления роста микроорганизмов был достоверно выше у АГВ на 14 % ( $p < 0.05$ ), чем у АГМ. В отношении *P. mirabilis* наблюдалась обратная тенденция: зоны подавления роста микроорганизмов для АГМ были достоверно больше на 10 % ( $p < 0.05$ ), чем для АГВ. Полученные результаты подтвердили, что разработанные материалы АГВ и АГМ обладают необходимой для медицинских перевязочных средств антибактериальной активностью [31].

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что благодаря полиэлектролитной природе, развитой микро- и мезопористой структуре, высокой влагопоглощающей способности и выраженным антибактериальным свойствам, исследуемые полимерные матрицы становятся идеальными кандидатами для потенциального применения в качестве местных гемостатических материалов.

Исследования гемостатической активности полученных образцов проводились в экспериментах на лабораторных крысах *in vivo*. Результаты исследования представлены на рис. 5. Для эксперимента использовали образцы материалов одинакового размера  $7 \times 7 \times 4$  мм<sup>3</sup>, близкие по массе, которые немедленно прикладывали к месту кровотечения и засекали время до его полной остановки. Критерием проявления гемостатических свойств считали уменьшение времени остановки кровотечения у опытных крыс при использовании исследуемых материалов (АГВ и АГМ) в сравнении с контрольной группой, где использовался ватный тампон (ВТ).

Согласно полученным результатам исследования продолжительности кровотечения (рис. 5в), наибольшее значение времени остановки кровотечения было зафиксировано для контрольной группы крыс с применением ВТ, наименьшее – при использовании АГВ. Время свертывания крови в экспериментальной группе для образца АГВ оказалось в два раза меньше, чем в контрольной, и составило 32.64 с. При этом статистически значимых отличий не было при сравнении значений времени продолжительности кровотечения для АГВ и АГМ, а также АГМ по сравнению с ВТ. Продолжительность кровотечения для АГМ составила 49.61 сек, что в 1.3 раза меньше ( $p = 0.278$ ), чем для ВТ.

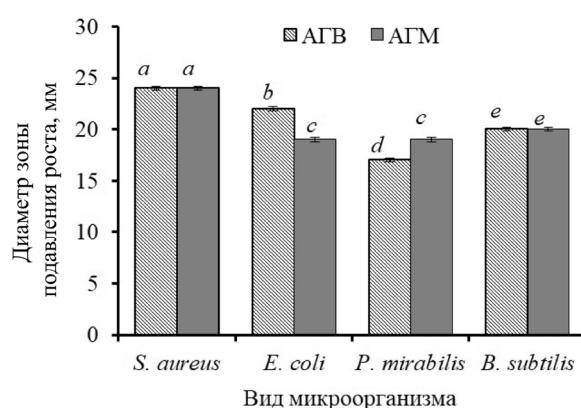
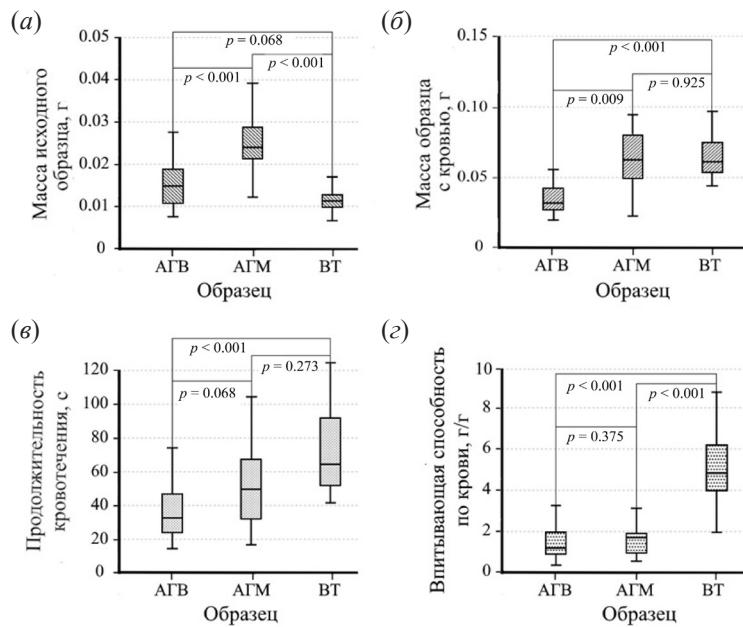


Рис. 4. Результаты определения зон ингибирования роста микроорганизмов для опытных образцов (для всех переменных с одинаковым индексом разница между средними значениями – не статистически значима,  $p < 0.05$ ).



**Рис. 5.** Основные показатели результатов исследования остановки кровотечения при использовании контрольного и опытных образцов местных гемостатических материалов в исследуемых группах лабораторных животных (Me [25; 75 квартили], n = 15): (a) – масса исходных образцов, (б) – масса образцов с впитанной кровью, (в) – продолжительность кровотечения, (г) – впитывающая способность по крови.

При анализе впитывающей способности материалов относительно крови (рис. 5г) было установлено, что статистически значимых различий между АГВ и АГМ нет ( $p = 0.375$ ): масса крови, впитанной АГВ, составила 1.52 г/г, масса крови, впитанной АГМ – 1.57 г/г. Полученные результаты для обоих образцов статистически значимо отличались от контрольного образца ВТ, значение впитывающей способности которого по крови составило 5 г/г. Различия в массе впитанной крови, вероятно, объясняются более выраженным гемостатическим эффектом разработанных образцов АГМ и АГВ, который обеспечивается за счет позитивных физико-химических характеристик (удельная поверхность, размер пор) и состава этих материалов (природа полисахаридов, активные добавки).

Проведенный сравнительный анализ гемостатической активности образцов АГВ и АГМ показал, что разработанные материалы характеризуются высокой скоростью остановки кровотечений, что позволяет им составить серьезную конкуренцию как на международном, так и на российском рынке фармацевтических препаратов и медицинских изделий. Гемостатическое действие образцов было подтверждено в эксперименте

на модели хвостовой раны крыс, с учетом показателей массы крови, впитанной образцом, а также продолжительности кровотечения.

После проведения дальнейших экспертиз (токсикологической и клинической) материалы на основе природных полимеров АЛ и ХТ с включением активных агентов (магнетита, ватерита) могут быть использованы в качестве локальных гемостатических средств для оказания быстрой доврачебной помощи и самопомощи, а также в экстренных и плановых хирургических вмешательствах, при бытовом травматизме, ранениях в условиях боевых действий, последствиях терактов и в медицине катастроф.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и материалы.** Для получения материалов использовали АЛ, выделенный из бурых водорослей Белого моря, производства АО “Архангельский опытный водорослевый комбинат” (Архангельск, Россия) с молекулярной массой 100 кДа и ХТ с ММ 200 кДа, полученный деацетилированием хитина, выделенного из панциря ракообразных, производства ООО “Биопрогресс” (Щелково, Россия) со степенью деацетилирования 0.89.

Получение аэрогельных материалов. Гидрогели получали смешением водного раствора АЛ и уксуснокислого раствора ХТ с концентрацией 0.25% при эквимолярном соотношении компонентов [24]. На стадии формирования комплекса в качестве активных добавок в количестве 10% от массы полисахаридов вводили частицы ватерита или магнетита, которые широко применяются в медицине как сшивающие, так и биоактивные (гемостатические и антибактериальные) агенты [18, 20]. Частицы ватерита получали смешением эквивалентных объемом 0.33 н. водных растворов карбоната натрия (ч.д.а., Вектон, Россия) и хлорида кальция (ч.д.а., Вектон, Россия) при перемешивании в течение 60 сек со скоростью 600 об/мин, после чего суспензию оставляли на 5–7 мин до полной кристаллизации частиц ватерита, которые затем сушили в течение 1 ч при 60°C. Размер частиц ватерита составлял 2 мкм. Частицы магнетита получали смешиванием эквивалентных по объему водных растворов 0.01 М сульфата железа (II) (ч.д.а., Вектон, Россия) и 0.02 М хлорида железа (III) (ч.д.а., Вектон, Россия) при непрерывном перемешивании в течение 60 сек со скоростью 600 об/мин, после чего приливали 1.5-кратный избыток 0.12 М раствора гидроксида аммония (ос.ч., Сигма Тек, Россия) и оставляли на 30 мин до выпадения осадка магнетита, который затем сушили в течение 1 ч при 60°C. Размер частиц магнетита составлял 20 нм. Для получения аэрогелей водную фазу в структуре гидрогеля замещали ацетоном (99.5%, х.ч., Экос-1, Россия), после чего образцы сушили в токе сверхкритического диоксида углерода при температуре 40°C и давлении 100 атм. на установке MV-10ASFE (Waters, США).

**Текстурные характеристики материалов.** Параметры пористой структуры материалов были получены методом низкотемпературной адсорбции азота на анализаторе удельной поверхности ASAP 2020 MP (Micromeritics, США). Обработку изотерм адсорбции-десорбции азота проводили с использованием различных расчетных методов: расчет удельной поверхности, суммарного объема пор и средней ширины пор выполняли по методу БЭТ; *t*-plot метод использовали для определения площади поверхности мезопор и оценки объема микропор, методы Horvath-Kawazoe и BJH применяли для оценки распределения пор по размерам (для микропор и мезопор, соответственно). Объем

мезопор рассчитывали по разнице суммарного объема сорбирующих пор и объема микропор. Погрешность измерений составила 0.5%.

Влагопоглощение материалов изучали гравиметрическим методом по отношению к физиологическому раствору (0.9% NaCl), моделирующему кровь теплокровных животных и человека. Материалы погружали в чашу с раствором, накрывали крышкой и выдерживали в термостате при температуре 37°C 10 мин. Образцы перед взвешиванием промокали фильтровальной бумагой. Результаты оценивали по показателю степени набухания (*q*, г/г), который рассчитывали по отношению массы адсорбированной жидкости к массе сухого материала [32]. Коэффициент скорости набухания образцов (*k*, мин<sup>-1</sup>) рассчитывали по формуле (1) [33]:

$$k = \frac{1}{\tau \cdot \ln \left( \frac{q_p}{q_p - q_\tau} \right)}, \quad (1)$$

где *q<sub>p</sub>* и *q<sub>τ</sub>* – степень набухания образца при достижении равновесия в системе и в момент времени *τ*, соответственно.

**Антимикробная активность.** Определение antimикробной активности композитных аэрогелей проводили диско-диффузионным методом [34]. В качестве тест-культур использовали штаммы двух видов грамположительных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, и два вида грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 3177.

**Гемостатическая активность.** Изучение влияния гемостатического средства на остановку кровотечения проводили в лабораторных условиях на белых крысах обоего пола массой 180–200 г, предварительно наркотизированных с помощью хлороформа, содержащихся в одинаковых условиях на стандартном пищевом режиме. Для каждого эксперимента использовали по 15 крыс. Для создания венозного кровотечения проводили венесекцию хвостовой вены с использованием гистологического ножа. Остановку кровотечения выполняли с помощью равномерного нанесения гемостатического средства на всю поверхность раны.

Испытания разработанных материалов проводили в сравнении со стерильным медицинским ватным тампоном из 100%-хлопчатобумажного нетканого материала (Winner Medical, Китай) в качестве контроля. После рассечения сосуда мате-

риал размером  $7 \times 7 \times 4$  мм<sup>3</sup> немедленно прикладывали к месту повреждения и засекали время до полной остановки кровотечения. Время остановки кровотечения определяли по моменту образования тромба и полному отсутствию проникновения крови через поверхность материала, зафиксированного на ране. Время остановки кровотечения регистрировали визуально с помощью секундомера. Впитывающую способность материала по крови оценивали как разницу в массе материала до операции и после его пропитывания кровью, отнесенную к массе материала до операции.

**Статистический анализ данных.** Статистическая обработка результатов была выполнена с использованием пакетов IBM SPSS for Windows (версия 24.0) и Excel (Microsoft Office 2010) по общепринятым методическим рекомендациям. Оценку распределения признака количественных данных проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. Результаты представлены в виде медианы и интерквантильного размаха (Ме [25–75 квартили]). Критерием уровня статистической значимости считали значение  $p < 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе комплекса альгината и хитозана с введением активных добавок (магнетит и ватерит) синтезированы два образца композиционных аэрогельных материалов: АГВ и АГМ, соответственно. Параметры пористой структуры образцов исследованы методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота. Оба образца обладают развитой микро-мезопористой структурой. Удельная поверхность материала с добавлением частиц ватерита (АГВ) оказалась в 1.3 раза выше, чем у материала с добавкой магнетита (АГМ), и составила 400 м<sup>2</sup>/г.

Сравнительное исследование сорбционных свойств материалов по отношению к физиологическому раствору (0.9 % NaCl), моделирующему кровь теплокровных животных и человека, показало, что кривые набухания обоих материалов соответствуют характеристикам ограниченно набухающих полимеров. Впитывающая способность АГВ достигает 67 г/г, что в 1.5 раза превышает этот показатель для АГМ.

Результаты тестирования антимикробной активности материалов подтвердили их высокую эффективность для биомедицинских целей. Оба

материала проявляют выраженную антибактериальную активность против всех исследуемых штаммов бактерий. Наибольшее ингибирующее действие наблюдается в отношении грамположительных бактерий *S. aureus* и *B. subtilis*, диаметры зон подавления роста которых достигли  $24 \pm 0.2$  мм и  $20 \pm 0.2$  мм соответственно, и значимо не отличались между образцами ( $p < 0.05$ ).

Сравнительный анализ гемостатической активности образцов АГВ и АГМ показал, что разработанные материалы обладают высокой скоростью остановки кровотечений по сравнению с ватным тампоном. Время свертывания крови в экспериментальной группе для материала, содержащего ватерит и магнетит, составило 32.6 и 49.6 с соответственно, что в 1.3–2 раза меньше, чем в контрольной группе с ватным тампоном.

После проведения дальнейших экспертиз (токсикологической и клинической) разработанные материалы могут быть использованы в качестве локальных гемостатических средств при плановых хирургических вмешательствах или для оказания доврачебной помощи.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследования проведены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-23-10021).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит экспериментов с участием людей в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

Все экспериментальные исследования с животными проводились в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”), а также с учетом требований “Международной Хельсинкской конвенции о гуманном отношении к животным” (1972).

Уход за экспериментальными животными и их содержание в условиях вивария соответствовали стандартам и требованиям приказов: “Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев” № 1045–73 от 06.04.1973 г.; № 1179 от 10.10.1983 г. МЗ СССР; № 267 от 19.06.2003 г. МЗ РФ; “Правила обращения, содержания, обезболивания и умерщвления экспериментальных животных”, утвержденные МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977); Принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

## ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Липатов В.А., Лазаренко С. В., Северинов, Д.А., Денисов А.А., Падалкина О.В.* // Журнал им. НВ Склифосовского “Неотложная медицинская помощь”. 2024. Т. 13. С. 241–246.
2. *Северинов Д.А., Лазаренко С.В., Сотников К.А., Похожай В.В., Ансимова П.В., Липатов В.А.* // Современ. технологии в мед. 2020. Т.12. С. 139–149.
3. *Tompeck A.J., Dowling M., Johnson S.B., Barie P.S., Winchell R.J., King D., Narayan M.* // J. Trauma Acute Care Surger. 2020. V. 88. P. 1–21.
4. *Бежин А.И., Солдатова Д.С., Истрянов Л.П., Истрянова Е.В., Литвиненко И.В., Рыжов А.С.* // Оперативн. хирург. клинич. анатомия. 2018. Т. 2. С. 11–17.
5. *Сопромадзе С.Ш., Липатов В.А.* // Innov. 2020. Т. 3. С. 42–47.
6. *Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Borisov S.A., Dushkin A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 438–450.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060219>
7. *Кузнецова Т.А., Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Хотимченко Ю.С.* // Биология моря. 2021. Т. 47. С. 3–12.
8. *Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С.* // Усп. биологич. химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
9. *Белозерская Г.Г., Макаров В.А., Жидков Е.А.* // Хим.-фарм. журн. 2006. Т. 40. С. 9–15.  
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2006-40-7-9-15>
10. *Самохвалов И.М., Головко К.П., Рева В.А.* // Вестн. Рос. военно-мед. акад. 2013. Т. 44. С. 187–191.
11. *Молчанова А.А., Гринберг В.Б., Кушиков К.Т.* // Вестник АГИУВ. 2018. № 2. С. 23–26.
12. *Маевская Е.Н., Дресвянина Е.Н., Шабунин А.С., Добровольская И.П., Панеях М.Б., Федюк А.М., Зиновьев Е.В.* // Рос. нанотехнол. 2020. Т. 15. С. 493–504.
13. *Kozen B.G., Kircher S.J., Henao J.* // Acad. Emerg. Med. 2008. V. 15. P. 74–79.
14. *Белозерская Г.Г., Макаров В.А., Момот А.П., Джулакян У.Л., Малыхина Л.С., Неведрова О.Е.*
15. *Sharma A., Verma C., Singh P., Mukhopadhyay S., Gupta A., Gupta B.* // Int. J. Biol. Macromol. 2024. V. 264. P. 130771.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130771>
16. *Белозерская Г.Г., Бычичко Д.Ю., Кабак В.А., Лемперт А.Р., Неведрова О.Е., Малыхина Л.С., Момот А. П.* // Клин. физиолог. кровообр. 2018. Т. 15. С. 222–229.
17. *Швецов И.С.* // Соврем. наука: актуал. пробл. теории и практики. Сер.: Естеств. и техн. Наук. 2021. Т. 5. С. 230–235.
18. *Горшкова Н.А., Паламарчук И.А., Бровко О.С., Слобода А.А., Ивахнов А.Д., Малков А.В., Богданович Н.И., Ловдина Т.И.* // Сверхкритич. флюиды: теория и практика. 2024. Т. 19. С. 13–29.  
<https://doi.org/10.34984/SCFTP.2024.19.3.002>
19. *Горшкова Н.А., Бровко О.С., Паламарчук И.А., Боголицын К.Г.* // Прикладн. биохим. микробиол. 2022. Т. 58. С. 123–131.
20. *Горшкова Н.А., Бровко О.С., Паламарчук И.А., Ивахнов А.Д., Богданович Н.И., Воробьева Т.Я.* // Прикл. биохим. микробиол. 2024. Т. 60. С. 25–32.  
<https://doi.org/10.31857/S0555109924020038>
21. *Белозерская Г.Г.* // Хирургия. 2004. Т. 9. С. 55–59.
22. *Липатов В.А., Северинов Д.А., Саакян, А.Р.* // Innov. 2019. Т. 1. С. 16–22.
23. *Gorshkova N.A., Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Ivakhnov A.D., Bogolitsyn K.G., Bogdanovich N.I., Chukhchin D.G.* // Russ. J. Physical Chem. B. 2021. V. 15. P. 1135–1141.  
<https://doi.org/10.1134/S1990793121070058>
24. *Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Boitsova T.A., Bogolitsyn K.G., Valchuk N.A., Chukhchin D.G.* // Macromol. Res. 2015. V. 23. P. 1059–1067.
25. *Sergeeva A., Vikulina A.S., Volodkin D.* // Micro-machines. 2019. V. 10. P. 357.  
<https://doi.org/10.3390/mi10060357>
26. *Hingrajiya R.D., Patel M.P.* // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 244. P. 125251.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125251>
27. *Cai J., Chen X.* // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 39463–39469.
28. *Al-barudi A., Sinani G., Ulker Z.* // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2014. V. 109. P. 748–756.  
<https://doi.org/10.1007/s10971-024-06312-0>
29. *Li S., Renick P., Senkowsky J., Nair A., Tang L.* // Adv. Wound Care (New Rochelle). 2021. V. 10. P. 317–327.  
<https://doi.org/10.1089/wound.2019.1103>
30. *Opota O., Jaton K., Greub G.* // Clin. Microbiol. Infect. 2015. V. 21. P. 323–331.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.005>

31. Миклис Н.И., Алексеев И.С., Бурак И.И., Дороженко И.А., Гончаревич А.Л., Ладик Ю.С. // Вестник ВГМУ. 2020. Т.19. С. 40–47.
32. Семчиков Ю.Д., Жильцов С.Ф., Зайцев С.Д. // Введение в химию полимеров. СПб.: Лань, 2014. 222 с.
33. Маслова Н.В., Кочетова Ж.Ю., Суханов П.Т., Змеев А.В. // ИВУЗ. Химия и химическая технология. 2022. Т. 65. С. 27–34.
34. Семина Н.А., Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудинина С.А., Страчунский Л.С., Стецюк О.У., Среда З.С. // Клинич. микробиол. антимикробн. химиотер. 2004. Т. 6. С. 306–359.

## Composite Aerogel Materials with Hemostatic Effect Based on Alginate and Chitosan

**N. A. Gorshkova<sup>\*, #</sup>, O. S. Brovko<sup>\*</sup>, and S. L. Kashutin<sup>\*\*</sup>**

<sup>#</sup>Phone: +7 (8182) 41-20-86; e-mail: nat.gorshkova@mail.ru

<sup>\*</sup>N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Nikol'skiy 20, Arkhangelsk, 163020 Russia

<sup>\*\*</sup>Northern State Medical University, prosp. Troickiy 51, Arkhangelsk, 163000 Russia

Currently, there is a high global demand for new, effective hemostatic materials. Highly porous organic aerogels derived from bioactive polysaccharides of marine origin, such as sodium alginate and chitosan, show great promise for these applications. Due to their advanced structure and natural origin, these materials possess important properties such as biocompatibility, biodegradability, nontoxicity, chemical inertness, fibrousness, mechanical strength, and water insolubility.

In this study, composite aerogel materials were synthesized from a combination of alginate and chitosan, with the addition of active additives (magnetite and vaterite). Their properties were evaluated to assess their potential as hemostatic materials. The results show that the developed materials feature a well-developed micro-mesoporous structure, which provides a high moisture absorption capacity when exposed to a saline solution, simulating the pH of warm-blooded animals. The maximum absorbency was 67 and 43 g/g for the materials containing vaterite and magnetite, respectively, which can be attributed to differences in their porous structures.

The antimicrobial activity tests confirmed the suitability of these materials for biomedical applications. The materials exhibited the strongest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, with growth inhibition zones of  $24 \pm 0.2$  and  $20 \pm 0.2$  mm, respectively. A comparative analysis of their hemostatic performance *in vivo* demonstrated that the materials are capable of stopping bleeding at a higher rate than a cotton swab. Specifically, the blood clotting times for the materials containing vaterite and magnetite were 32.64 and 49.61 s, respectively, which is 1.3 to 2 times faster than the control group.

These findings indicate that composite aerogel materials based on a complex of sodium alginate and chitosan, with the inclusion of active additives (magnetite and vaterite), have strong potential to compete in both the international and Russian markets for hemostatic drugs and medical devices.

**Keywords:** alginate, chitosan, aerogel, hemostatic ability, hemostatic material, magnetite, vaterite