

· 综述 ·

## 甲壳素/壳聚糖及其衍生物与血液的相互作用

程沁园<sup>1</sup>, 张家骊<sup>2</sup>, 夏文水<sup>1\*</sup>(江南大学<sup>1</sup>食品学院食品科学与技术国家重点实验室;<sup>2</sup>医药学院, 无锡 214122)

**摘要** 甲壳素/壳聚糖是来源丰富的天然有机物, 具有多种生物活性且应用广泛。本文重点综述了甲壳素、壳聚糖及其衍生物的止血活性及作用机制的国内外研究进展, 并列举了一些已市售或正在研制中的甲壳素/壳聚糖基止血敷料。此外, 甲壳素/壳聚糖的特殊衍生物(如硫酸化衍生物)具有截然相反的抗凝血活性, 因此亦对其抗凝血衍生物的研究近况进行了介绍。

**关键词** 甲壳素; 壳聚糖; 衍生物; 止血; 抗凝血

**中图分类号** R318; R973.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)01-0092-05

## Interactions of chitin, chitosan and their derivatives with blood constituents

CHENG Qin-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Jia-li<sup>2</sup>, XIA Wen-shui<sup>1\*</sup><sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology; <sup>2</sup>School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract** Chitin and chitosan are natural organic matters with rich resources and wide applications due to their various bioactivities. In this paper, research progresses on the hemostasis activities and action mechanisms of chitin, chitosan, and their derivatives at home and abroad are summarized. Some hemostasis dressings based on chitin or chitosan are introduced. In addition, the derivatives such as sulfated derivatives showed the anticoagulant activity which contrary to chitin and chitosan, so their recent research developments are also presented.

**Key words** chitin; chitosan; derivative; hemostasis; anticoagulation

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA091603); the Objective-Oriented Project of State Key Laboratory of Food Science and Technology (No. SKLF-MB-200805); the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. 0627) and the Innovation and Intellect-Usher Project of Higher Education (111 Project) (No. B07029)

## 1 概述

甲壳素(chitin)又名甲壳质、几丁质、壳多糖和聚乙酰氨基葡萄糖等,是由N-乙酰-2-脱氧-2-氨基-D-葡萄糖以β-1,4-糖苷键形式连接而成的多糖,是一种维持和保护甲壳动物和微生物躯体的线性氨基多糖,广泛存在于节足动物类(蜘蛛类、甲壳类)的翅膀或外壳中,也存在于真菌和藻类的细胞壁中,另外还可来源于有机酸类、抗生素与酶的酿造副产物<sup>[1]</sup>。甲壳素是一种丰富的自然资源,是继纤维素之后地球上最丰富的天然有机物。壳聚糖(chitosan)是

甲壳素的N-脱乙酰基的产物,是自然界中唯一的天然碱性多糖,也是少数具有正电荷的天然产物之一<sup>[2]</sup>,无毒,物理和化学性质相对稳定,同时具有良好的生物相容性和生物降解性,因此在医药、生物、化工、环境、食品等诸多方面显示出良好的应用前景<sup>[2-3]</sup>。

自1977年Muzzarelli首度报道了甲壳素对人类创伤的作用<sup>[4]</sup>后,甲壳素和壳聚糖及其衍生物与血液的相互作用就成为研究热点之一。多年研究显示:甲壳素、壳聚糖及部分衍生物都具有良好的止血活性,其作用机制目前虽尚未明确,但可以肯定的是其作用过程完全不同于一般传统

\* 收稿日期 2010-08-04 \* 通讯作者 Tel:0510-85919121 E-mail:xiaws@jiangnan.edu.cn

**基金项目** 国家高技术研究发展计划(“八六三”计划)资助项目(No. 2007AA091603);食品科学与技术国家重点实验室目标导向资助项目(No. SKLF-MB-200805);教育部长江学者与创新团队发展计划资助项目(No. 0627);高等学校学科创新引智计划资助项目(111计划)(No. B07029)

的止血剂。因而一系列基于甲壳素和壳聚糖的止血材料已得到大力开发并有部分已投入市场,在一定领域内取得优异的应用效果。除此之外,另一些甲壳素和壳聚糖的硫酸化衍生物具有突出的抗凝血效果,可与临床应用广泛的肝素相媲美,目前也是研究开发的热点之一。

## 2 止血作用

### 2.1 甲壳素和壳聚糖的止血作用

Okamoto 等<sup>[5]</sup>利用犬全血评价了不同浓度(0.000 1 ~ 1.0 mg/mL)的甲壳素和壳聚糖的血液凝固作用,实验结果表明甲壳素和壳聚糖缩短血液凝固时间(blood coagulation time, BCT)具有显著的剂量依赖性,且在终浓度为 0.1 mg/mL 的实验组中,甲壳素和壳聚糖仍可分别将 BCT 缩短至 3.7 和 4.7 min(空白对照组为 12 min)。即使在使用肝素制造的抗凝血兔模型中,壳聚糖也可有效的将出血时间控制在正常范围内<sup>[6]</sup>。Gu 等<sup>[7]</sup>制备了一种来源于蛆壳的壳聚糖海绵并将其作为可吸收的急救止血剂在肝素化的大鼠出血模型体内应用,结果显示该壳聚糖海绵在急性和慢性的出血模型中止血效果都优于明胶海绵和氧化纤维素。因而,肝素的存在并不影响壳聚糖的止血功能,这是壳聚糖作为止血剂的特别之处,具有极大的开发价值。

目前已开发的壳聚糖绷带已可在大动脉、肝、肺、肾及心室的大型外科手术和外伤急救中达到快速止血的效果<sup>[8]</sup>。

### 2.2 衍生物的止血作用

鉴于甲壳素和壳聚糖的止血活性,大量化学结构或立体结构各异的衍生物已被开发研究。

Janvikul 等<sup>[9]</sup>测定了包括甲壳素、壳聚糖、部分 *N*-乙酰壳聚糖(PNAC)、*N*,*O*-羧甲基壳聚糖(NOCC)、*N*-硫酸化壳聚糖、*N*-(2-羟基)丙基-3-三甲基壳聚糖盐酸盐等几种材料的全血凝血时间(whole blood clotting time, WHBCT)及血浆复钙时间(plasma recalcification time, PRT)。结果显示甲壳素、壳聚糖、NOCC 的 WHBCT 相较于空白全血显著降低( $P < 0.05$ ),而 PNAC 并未能显著降低 WHBCT,但其加入可显著减少 PRT,作用效果与甲壳素、NOCC 相近。

在犬的松质骨出血研究中,部分脱乙酰化的微晶甲壳素盐酸盐展示出的止血效果优于传统止血剂,可与胶原蛋白-盐酸盐媲美,加之其理化特性优良,可开发为高效的局

表 1 基于甲壳素和壳聚糖的市售止血敷料<sup>[17]</sup>

止血敷料	生产商	产品特性
HemCon <sup>®</sup>	HemCon	冻干壳聚糖乙酸盐,用于突发情况的止血
Chitoflex <sup>®</sup>	HemCon	基于壳聚糖、抗菌、生物相容创伤敷料,设计用于塞入创口中以控制中等至剧烈程度的出血
Chitoseal <sup>®</sup>	Abbott	基于壳聚糖,背部为纤维素 <sup>[18]</sup> ,用于出血伤口
Clo-Sur <sup>®</sup>	Scion	基于壳聚糖,可加速伤口愈合 <sup>[18]</sup>
TraumaStat <sup>®</sup>	Ore-Medix	冻干的含多孔硅土的壳聚糖
Syvek-Patch <sup>®</sup>	Marine Polymer Technologies	由分离自硅藻 <i>Thalassiosira fluviatilis</i> 、三维 $\beta$ -结构排列的晶体、完全乙酰化、高相对分子质量的甲壳素制得 <sup>[19]</sup> 。据报道其止血速度为纤维蛋白的 7 倍,原理是其可黏附红细胞、激活血小板,而其伪足可进一步与甲壳素接触并促进纤维蛋白凝胶的形成,以达到止血效果,且肝素化病人也可用

部止血剂<sup>[10]</sup>。Hoekstra 等<sup>[11]</sup>将微晶壳聚糖应用于肝素化犬的研究结果显示,其能显著减少鞘导管和导尿管拔出后人工压迫血管的止血时间( $P = 0.016$ )。类似的结果也见于大鼠研究中,微晶壳聚糖可相对更快地封闭大动脉创口。

Bochicchio 等<sup>[12]</sup>开发了一种改性壳聚糖胶布(MCP)用于低体温的肝 V 级损伤的抗凝猪模型。MCP 组处理后的出血量显著减少并且复苏后的平均动脉压显著增大( $P < 0.000 1$ ,  $P < 0.018$ ),而平均流动性复苏体积显著减少( $P < 0.005 6$ )。MCP 可使止血时间平均缩短至 5.2 min,而标准胶布组从未能达到该水平。伤口处理 1 h 后,所有由 MCP 处理的动物都存活了,但对照组只剩余一半。

一系列壳聚糖多磷酸盐敷料被制备后在体外与壳聚糖和纱布对比研究了其止血效用<sup>[13]</sup>。与壳聚糖相比,最优化配方的壳聚糖多磷酸盐可加速血液凝结( $P = 0.011$ )、增强血小板聚集( $P = 0.002$ )、加速凝血酶生成( $P = 0.002$ )、吸收更多血液( $P < 0.001$ )。

Ono 等<sup>[14]</sup>制备了一种新型的光交联壳聚糖(Az-CH-LA),既含有乳糖部分结构,又具有光反应叠氮基。这种壳聚糖水凝胶伴随着紫外辐照用于颈动脉的小孔可在( $1 \pm 1$ ) min 内止血,快于纤维蛋白胶( $3 \pm 1$ ) min。伴有紫外辐照的壳聚糖水凝胶体内应用 90 s( $n = 7$ )或使用纤维蛋白胶 5 min( $n = 2$ )均可使颈动脉完全停止出血。该水凝胶也可止住肝素化兔颈静脉的小孔出血。紫外辐照 30 s 的壳聚糖水凝胶可完全停止断尾小鼠的出血,并可将小鼠的两片皮肤牢固黏合起来<sup>[6]</sup>。这种封闭能力与纤维蛋白胶类似甚至更强。该光交联壳聚糖也可用于食管内肿瘤的内窥镜治疗<sup>[15]</sup>。

Peng 等<sup>[16]</sup>报道了一系列由氧化葡聚糖(odex)和含氨基的多聚物合成的新型原位成型的水凝胶,这些多聚物包括聚丙烯胺(PAA)、壳寡糖(oligochi)和乙二醇壳聚糖(glycolchi)。他们利用凝血弹性描记法在体外检测了这些凝胶的血液凝结作用。与空白血液组相比,除 Odex-Oligo-chi 外,其余凝结系统均可显著缩短可测凝块形成时间(R time)。Odex-PAA 凝胶使凝块强度的最大振幅(MA)增大,Odex-Oligo-chi 和 Odex-Glycolchi 时 MA 减小,而只有 Odex-Oligo-chi 使达到 MA 的时间(TMA)延长。

### 3 止血产品

在甲壳素和壳聚糖各项特性的研究基础上,多种以它们为基础的止血敷料已被开发并投入市场。

1999年,一组来自于 Oregon Medical Laser Center 的专家开始帮助美国军方研究开发一种性能更为优良的止血绷带<sup>[20]</sup>,于是壳聚糖基敷料诞生了。这种新材料可加速止血、方便耐用,即便在干燥条件下也具有有良好的黏附性。2002年,FDA批准了一种由 HemCon 医疗技术公司为伊拉克和阿富汗战场上的军队开发的壳聚糖基止血产品<sup>[21-22]</sup>。这种 HemCon 敷料应用于多部位创口,其使用使 97% 的病例停止出血或加速止血,且无并发症或不良反应。Young 等<sup>[23]</sup>在肝素化羊体内行导管插入术后快速人工压迫止血或用促凝血的壳聚糖基的 HemCon 绷带止血,比较浅表股动脉的造影变化和组织病理学变化。结果显示 HemCon 绷带组的止血时间更短( $6.18 \pm 1.87$  min)、皮下血肿更少(26.3%),而人工压迫组的止血时间为( $9.61 \pm 3.35$ ) min、血肿为 68.4%,*P* 分别为 0.003 和 0.009。一篇新近文章报道了 HemCon 绷带在民用紧急医疗救护(EMS)系统中的应用<sup>[24]</sup>,79% 的病例控制了出血,其中大部分是在 3 min 内止血的。此外,HemCon 敷料的临床使用经验已开始在大澳大利亚昆士兰州的直升机医疗救护(HEMS)系统中应用<sup>[25]</sup>。

在体外止血材料的基础上,HemCon 公司又开发了一种新型的体内用壳聚糖基敷料,由高纯度壳聚糖海绵体和一种不可渗透但生物可吸收的柔软的 TephaFLEX 多聚物衬料(Tepha 公司)组成。这种体内用壳聚糖敷料是设计作为可植入的局部止血材料用于控制手术中的急性出血。Xie 等<sup>[26]</sup>评价了这种敷料控制腹腔镜肾部分切除术(LPN)后的软组织伤的出血和尿渗漏的可行性。在 18 个病例中,有 17 例在使用壳聚糖敷料后达到了完全止血,止血指数都得到了显著提高,可在急性动物模型中有效控制软组织出血和尿渗漏。

TraumaStat(Ore-Medix)是将壳聚糖与多孔硅和聚乙烯结合的类似纱布的产品,但是其表面积是目前使用的壳聚糖敷料和纱布的 100 多倍。在股动脉横切模型中,TraumaStat 的止血效果优于纱布和 HemCon 敷料( $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ )<sup>[27]</sup>。该研究组又将 TraumaStat 与其他壳聚糖敷料及纱布分别应用于模拟特殊战场环境的 30 s 快速止血试验中<sup>[28]</sup>,TraumaStat 的止血失败率较低( $P < 0.005$ )、压迫后失血量减少( $P < 0.005$ )、且流动需求降低( $P < 0.005$ )。

在日本,甲壳素和壳聚糖的纤维和海绵已被兽医广泛应用作为动物伤口的填充敷料<sup>[29]</sup>。

目前仍有很多以甲壳素和壳聚糖为基础的止血材料正在试验研究中。Sohn 等<sup>[30]</sup>分别用 DS(一种双面的柔韧的壳聚糖敷料)、OS(单面敷料)和 CP(壳聚糖颗粒)处理动物剧烈动脉损伤出血,DS 敷料最为有效,可在 4 min 中控制

76% 的出血。Edwards 等<sup>[31]</sup>用浓度为 1% ~ 4% 的壳聚糖处理织物,随着壳聚糖浓度的增加,处理后的材料可有效控制血液渗入织物。

### 4 止血机制

由于甲壳素和壳聚糖出色的止血效果,其体外、体内的机制研究就成为热点之一。但目前仍未有定论,只是认为有几个因素对其止血作用影响较大。

#### 4.1 传统凝血途径和凝血因子对壳聚糖止血作用的影响

较为特别的是,许多研究结果都表明壳聚糖的止血机制似乎与经典的“瀑布理论”无关。Yang 等<sup>[32]</sup>的研究结果提示在壳聚糖止血的过程中凝血因子并未被激活;同样,Benesch 等<sup>[33]</sup>也观察到内源性凝血途径并未被激活。壳聚糖可在凝血因子缺乏的情况下诱导血块形成,也可在肝素化条件下保持其凝血活性。所以壳聚糖最为显著的医用价值可能就在于其能促进出血紊乱或治疗性抗凝血的患者的止血。

#### 4.2 血小板对壳聚糖止血作用的影响

许多文献也报道了甲壳素、壳聚糖与血小板之间的相互作用。Okamoto 等<sup>[5]</sup>测定血小板聚集性(PA)的结果显示甲壳素和壳聚糖可促进血小板衍生生长因子 AB(PDGF-AB)和转化生长因子  $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )由血小板中的释放,而壳聚糖效果更为显著。在犬血中,甲壳素盐酸盐诱导了血小板活化过程中的相关物质的释放,如  $\beta$  凝血球蛋白和血小板因子 4,同时其还具有极好的血细胞聚集性质<sup>[10]</sup>。低脱乙酰度的壳聚糖因能吸收较多的血小板而止血能力更强<sup>[34]</sup>。Chou 等<sup>[35]</sup>的研究结果显示在由壳聚糖包被的微量滴定板与血小板的最初(5 min)和长期(30 min)接触过程中,血小板的黏附呈现剂量依赖性;类似的,壳聚糖对血小板聚集的促进作用和 Fura-2-AM 负载血小板细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的升高作用也呈剂量依赖性;此外,通过流式细胞仪的检测可发现壳聚糖显著增强血小板糖蛋白 II b/III a 复合物的表达。

#### 4.3 红细胞对壳聚糖止血作用的影响

随着研究深入,越来越多的学者承认壳聚糖的止血作用不仅与血小板聚集有关,更与红细胞聚集有关。Klokkevold 等<sup>[36]</sup>利用扫描电镜评价了在壳聚糖处理的舌部切口上血液块的形成过程,发现红细胞失去了其典型的两面凹形形态且相互之间有异常的吸引力。当血液与壳聚糖乙酸盐的生理盐水溶液混合时,红细胞发生聚集并变形,而在相对分子质量为  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  的范围内,低脱乙酰度的壳聚糖盐溶液中红细胞的异常聚集和变形更为显著<sup>[32]</sup>。壳聚糖引起的红细胞黏附与聚集作用与其相对分子质量及其他物理特性相关。红细胞膜的负电荷与壳聚糖的正电荷基团间的离子作用力可能就是壳聚糖止血活性的一个原因。因而,载正电荷的壳聚糖作为止血剂比甲壳素更为有效<sup>[31,37-38]</sup>。

#### 4.4 补体系统对壳聚糖止血作用的影响

甲壳素和壳聚糖的分子链上大量的氨基和羟基基团在补体活化中发挥了重要的作用。部分壳聚糖衍生物,如硫酸化、磷酸化或羧甲基化壳聚糖,由于这两种基团含量较低而均不能强烈活化补体系统<sup>[39]</sup>。随着壳聚糖分子链的延长和脱乙酰化程度的提高,壳聚糖可成为补体系统的强激活剂<sup>[33]</sup>。

#### 4.5 血液其他成分对壳聚糖止血作用的影响

壳聚糖能吸附血液中大量的纤维蛋白原和其他血浆蛋白(如血清白蛋白、IgG等)<sup>[40]</sup>。有研究表明,与生理盐水对照组相比,甲壳素和壳聚糖对凝血酶形成的促进作用具有显著性差异,而且甲壳素更有形成血栓的趋势<sup>[41]</sup>。

综上所述,甲壳素和壳聚糖的止血过程与诸多因素有关,是一个复杂的过程。除了上述血液中相关物质的影响外,壳聚糖的止血作用与其化学性质(如相对分子质量、脱乙酰度等)和三级/四级结构高度相关,如微藻甲壳素纤维因其特殊的立体结构而显示出较其他壳聚糖更为突出的止血活性<sup>[17]</sup>。

### 5 硫酸化壳聚糖衍生物的抗凝血作用

许多学者指出硫酸化壳聚糖的化学结构与抗凝血药肝素很相似,都属于硫酸化黏多糖,而事实上,硫酸化壳聚糖确实也具有很好的抗凝血能力。

Park等<sup>[42]</sup>对比了具有不同链长和脱乙酰度的异壳聚糖(heterochitosan)及其寡糖的硫酸盐的凝血酶时间(TT)和活化部分凝血活酶时间(APTT),结果显示壳聚糖的TT活性依赖于脱乙酰度和相对分子质量,而90%脱乙酰度的壳聚糖硫酸盐具有所有样品中最高的APTT活性,显示了最好的抗凝血活性。Kim等<sup>[41]</sup>也报道了壳聚糖和硫酸化壳聚糖(COS)的体外抗凝血试验。Suwan等<sup>[43]</sup>制备了一系列低相对分子质量壳聚糖硫酸盐(相对分子质量为5 120~26 200),并对其抗凝血活性进行了比较研究,结果显示这些壳聚糖硫酸盐抗凝血的主要机制是通过调节肝素辅因子II,而这一作用与其相对分子质量相关,且每种低相对分子质量壳聚糖硫酸盐片段都显示了剂量依赖性的抑制血液凝固作用。

不同于肝素,硫酸化壳聚糖并不显示抗血小板活性,因而不会引起患者过多出血。壳聚糖硫酸盐具有较高的硫酸化程度将有助于其抗凝血活性<sup>[44]</sup>。硫酸基的取代位置和取代程度也被报道对壳聚糖硫酸盐的抗凝血过程具有巨大的影响,例如C-6位硫酸基是关键的条件,其脱硫酸化将导致活性的丢失<sup>[45]</sup>。硫酸化多聚糖的抗凝血活性一般都是硫酸基负电荷与多肽链上的正电荷相互作用的结果。N-乙酰基对抗凝血活性也有推动作用<sup>[45]</sup>。

壳聚糖衍生物硫酸化后的抗凝血活性同样也备受关注,如硫酸化的N-羧甲基壳聚糖纳米颗粒的抗凝血活性也正在研究中<sup>[46]</sup>。

### 6 展望

综上所述,甲壳素、壳聚糖及其部分衍生物都具有良好且作用途径特别的止血能力,它们的作用均与其相对分子质量、脱乙酰度、取代基种类和取代度等性质密切相关。甲壳素/壳聚糖类止血剂的作用机制不同于一般的传统止血剂,可以在凝血因子或血小板缺乏的情况下有效止血,并可在肝素化的抗凝血个体上促进血液凝固,因而其对凝血病患者或治疗性抗凝血的病人大有裨益。而硫酸化壳聚糖已被大量实验证明具有可与肝素相媲美的抗凝血活性,应用前景十分广阔。目前,甲壳素/壳聚糖及其衍生物与血液相互作用的机制虽未彻底阐明,但大量相关产品的研究与开发已是众多研究者的关注点之一。由于还具有无毒、生物相容性、体内可降解吸收等特点,甲壳素和壳聚糖及其衍生物将成为调节血液凝固的重要医用材料之一。

### 参考文献

- [1] 陈碧琼(Chen BQ),孙康(Sun K). 甲壳素和壳聚糖的医药应用及开发近况[J]. 中国药物化学杂志(*Chin J Med Chem*),2001,11(4):245-248.
- [2] 蒋挺大(Jiang TD). 壳聚糖[M]. 北京:化学工业出版社,2007:1-15.
- [3] 杨新超(Yang XC),赵祥瑞(Zhao XY),刘建军(Liu JJ). 壳聚糖的性质、生产及应用[J]. 食品与药品(*Food Drug*),2005,7(8A):59-62.
- [4] Muzzarelli RAA. *Chitin* [M]. Oxford: Pergamon Press,1977:262.
- [5] Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation[J]. *Carbohydr Polym*,2003,53(3):337-342.
- [6] Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, et al. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process[J]. *Biomaterials*,2002,23(3):833-840.
- [7] Gu R, Sun W, Zhou H, et al. The performance of a fly-larva shell-derived chitosan sponge as an absorbable surgical hemostatic agent[J]. *Biomaterials*,2010,31(6):1270-1277.
- [8] Owens M, Senrud A, Teach J, et al. A device for the deployment of internal esophageal chitosan bandage[J]. *Gastrointest Endosc*,2006,63(5):AB237.
- [9] Janvikul W, Uppanan P, Thavornytikarn B, et al. *In vitro* comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives[J]. *J Appl Polym Sci*,2006,102(1):445-451.
- [10] Sugamori T, Iwase H, Maeda M, et al. Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride[J]. *J Biomed Mater Res*,2000,49(2):225-232.
- [11] Hoekstra A, Struszczyk H, Kivekas O. Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture sites[J]. *Biomaterials*,1998,19(16):1467-1471.
- [12] Bochicchio G, Kilbourne M, Kuehn R, et al. Use of a modified chitosan dressing in a hypothermic coagulopathic grade V liver injury model[J]. *Am J Surg*,2009,198(5):617-622.

- [13] Ong SY, Wu J, Mochhala SM, *et al.* Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties[J]. *Biomaterials*, 2008, **29**(32): 4 323 – 4 332.
- [14] Ono K, Ishihara M, Ozeki Y, *et al.* Experimental evaluation of photocrosslinkable chitosan as a biologic adhesive with surgical applications[J]. *Surgery*, 2001, **130**(5): 844 – 850.
- [15] Hayashi T, Matsuyama T, Hanada K, *et al.* Usefulness of photocrosslinkable chitosan for endoscopic cancer treatment in alimentary tract [J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2004, **71**(2): 367 – 372.
- [16] Peng HT, Shek PN. Development of *in situ*-forming hydrogels for hemorrhage control [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2009, **20**(8): 1 753 – 1 762.
- [17] Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, **76**(2): 167 – 182.
- [18] Hirsch JA, Reddy SA, Capasso WE, *et al.* Non-invasive hemostatic closure devices: “patches and pads” [J]. *Tech Vasc Inter Radiol*, 2003, **6**(2): 92 – 95.
- [19] Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical science [J]. *Adv Polym Sci*, 2005, **186**: 151 – 209.
- [20] Devlin JJ, Kircher S, Kozen BG, *et al.* Comparison of ChitoFlex, CELOX, and QuikClot in control of hemorrhage [J]. *J Emerg Med*, 2009, doi:10.1016/j.jemermed.2009.02.017.
- [21] Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE, *et al.* A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations [J]. *J Trauma*, 2006, **60**(3): 655 – 658.
- [22] Kilbourne M, Keledjian K, Hess JR, *et al.* Hemostatic efficacy of modified amylopectin powder in a lethal porcine model of extremity arterial injury [J]. *Ann Emerg Med*, 2009, **53**(6): 804 – 810.
- [23] Young HK, Dusan P, Hideyaki K, *et al.* Thrombus formation after percutaneous catheterization and manual compression of the femoral artery in heparinized sheep [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2010, **33**(2): 321 – 329.
- [24] Brown MA, Daya MR, Worley JA. Experience with chitosan dressings in civilian EMS system [J]. *J Emerg Med*, 2009, **37**(1): 1 – 7.
- [25] Fludger S, Bell A. Tourniquet application in a rural Queensland HEMS environment [J]. *Air Med J*, 2009, **28**(6): 291 – 293.
- [26] Xie H, Khajanchee YS, Teach JS, *et al.* Use of a chitosan-based hemostatic dressing in laparoscopic partial nephrectomy [J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2008, **85**(1): 267 – 271.
- [27] Englehart MS, Cho SD, Tieu BH, *et al.* A novel highly porous silica and chitosan-based hemostatic dressing is superior to HemCon and gauze sponges [J]. *J Trauma*, 2008, **65**(4): 884 – 892.
- [28] Sambasivan CN, Cho SD, Zink KA, *et al.* A highly porous silica and chitosan-based hemostatic dressing is superior in controlling hemorrhage in a severe groin injury model in swine [J]. *Am J Surg*, 2009, **197**(5): 576 – 580.
- [29] Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, **8**(3): 203 – 226.
- [30] Sohn VY, Eckert MJ, Martin MJ, *et al.* Efficacy of three topical hemostatic agents applied by medics in a lethal groin injury model [J]. *J Surg Res*, 2009, **154**(2): 258 – 261.
- [31] Edwards JV, Howley P, Prevost N, *et al.* Positively and negatively charged ionic modifications to cellulose assessed as cotton-based protease-lowering and hemostatic wound agents [J]. *Cellulose*, 2009, **16**(5): 911 – 921.
- [32] Yang J, Tian F, Wang Z, *et al.* Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis [J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2008, **84**(1): 131 – 137.
- [33] Benesch J, Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan [J]. *Biomaterials*, 2002, **23**(12): 2 561 – 2 568.
- [34] Wu Y, Hu Y, Cai J, *et al.* Coagulation property of hyaluronic acid-collagen/chitosan complex film [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, **19**(12): 3 621 – 3 629.
- [35] Chou TC, Fu E, Wu CJ, *et al.* Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302**(3): 480 – 483.
- [36] Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, *et al.* The effect of chitosan (poly-*N*-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 1999, **57**(1): 49 – 52.
- [37] Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010, **56**(3): 290 – 299.
- [38] Kim SK, Niranjana R. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review [J]. *Carbohydr Polym*, 2005, **62**(4): 357 – 368.
- [39] Suzuki Y, Miyatake K, Okamoto Y, *et al.* Influence of the chain length of chitosan on complement activation [J]. *Carbohydr Polym*, 2003, **54**(4): 465 – 469.
- [40] Benesch J, Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan [J]. *Biomaterials*, 2003, **23**(12): 2 561 – 2 568.
- [41] Fischer TH, Bode AP, Demcheva M, *et al.* Hemostatic properties of glucosamine-based materials [J]. *J Biomed Mater Res*, 2007, **80**(1): 167 – 174.
- [42] Park PJ, Je JY, Jung WK, *et al.* Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates [J]. *Eur Food Res Technol*, 2004, **219**(5): 529 – 533.
- [43] Suwan J, Zhang Z, Li B, *et al.* Sulfonation of papain-treated chitosan and its mechanism for anticoagulant activity [J]. *Carbohydr Res*, 2009, **344**(10): 1 190 – 1 196.
- [44] Drozd NN, Sher AI, Makarov VA, *et al.* Comparison of antithrombin activity of the polysulphate chitosan derivatives in *in vivo* and *in vitro* system [J]. *Thromb Res*, 2001, **102**(5): 445 – 455.
- [45] Prashanth KVH, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2007, **18**(3): 117 – 131.
- [46] Iliina AV, Levov AN, Mestechkina NM, *et al.* The production of nanoparticles based on sulfated polysaccharides and a study of their anticoagulant activity [J]. *Nanotechnol Russ*, 2009, **4**(3/4): 244 – 252.