

*Н. И. Мельнова¹, И. С. Жаворонок², И. Н. Жук¹, Е. Л. Бердина¹, Н. М. Ермалюк¹,
О. К. Куцук¹, Л. Л. Логинова¹, С. В. Андреев¹, Г. Г. Кондратенко², В. Н. Гапанович¹*

**ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ГАМАСТАТ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРЕНХИМАТОЗНОМ КРОВОТЕЧЕНИИ
ИЗ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОЙ ГИПОКОАГУЛЯЦИИ**

УП «ЛОТИОС»¹,

УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

В эксперименте изучены гемостатические свойства нового отечественного лекарственного средства Гамастат при экспериментальном паренхиматозном кровотечении из печени на фоне

□ Оригинальные научные публикации

повышенной кровоточивости. Исследование выполнено на 38 крысах линии Вистар, разделенных на три серии: первую – с травмой печени без применения гемостатических средств (контрольная серия), вторую – с травмой печени и применением коммерческого гемостатического средства вискостат («Ultradent», США; серия сравнения) и третью – крысы с травмой печени и применением разработанного лекарственного средства Гамастат (опытная серия). Общим контролем служила группа из 8 интактных животных. Определяли длительность кровотечения и величину кровопотери, динамику изменений цитологических показателей крови, параметров сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза. Установлена выраженная гемостатическая активность Гамастата в условиях системной гипокоагуляции.

Ключевые слова: гемостатические средства, остановка кровотечения.

**N. I. Melnova, I. S. Zhavoronok, I. N. Zhuk, E. L. Berdina, N. M. Ermalyuk,
O. K. Kutsuk, L. L. Loginova, S. V. Andreev, G. G. Kondratenko, B. H. Gapanovich**

APPLICATION OF THE NEW HEMOSTATIC MEDICINE GAMASTAT AT PARENCHYMATOUS BLEEDING IN EXPERIMENT IN THE CONDITIONS OF HYPOCOAGULATION

In experiment haemostatic properties of new medicine Gamastat are studied at experimental parenchymatous bleeding from a liver in the conditions of system hypocoagulation are studied. Research is executed on 38 rats of the line the Vistar, divided into three series: the first – with an injury of a liver without application of haemostatic means (a control series), the second – with an injury of a liver and application of commercial haemostatic means Viskostat («Ultradent», the USA; a comparison series) and a third – rats with an injury of a liver and application of the developed medicine Gamastat (pilot batch). As the general control the group of 8 intact animals served. Investigated the bleeding duration and size, dynamics of changes of cytologic indexes of blood, parameters of primary and coagulative hemostasis. It was established that medicine Gamastat possesses the expressed haemostatic activity in the conditions of system hypocoagulation.

Key words: hemostatics, bleeding stop.

Сособой остротой проблема гемостаза стоит в хирургии паренхиматозных органов (печень, селезенка, почки), что связано с особенностями их кровообращения, возросшей частотой повреждений, а также увеличением количества оперативных вмешательств на этих органах [5]. Так, повреждения печени при травме живота встречаются в 32,6% случаев, селезенки – в 23–54% [2], в совокупности по частоте они занимают 1 место среди повреждений всех органов брюшной полости.

Эффективность остановки паренхиматозных кровотечений во время операции во многом зависит от функционального состояния клеточного и плазменного звеньев свертывающей системы крови больного, имеющих сложный и зачастую индивидуальный характер. Существуют возможности влияния на эти механизмы гемостаза посредством переливания компонентов крови, факторов свертывания, ингибиторов фибринолиза и других средств. Однако эти средства оказывают системное влияние и не фокусируют свое действие в области кровотечения. В отличие от них гемостатические средства местного (локального) действия проявляют свои целевые свойства адресно, что делает возможным их использование прицельно, в том числе и при паренхиматозных диффузных кровотечениях, когда системные методы гемостаза мало эффективны [8].

Все больший интерес вызывает возможность применения для остановки кровотечений с помощью гемостатических лекарственных средств на основе не-

органических солей, способных оказывать локальное фармакотерапевтическое действие. Однако применяемые в настоящее время вещества этой группы не всегда обладают гемостатическим эффектом необходимой силы. Так, присутствующие на фармацевтическом рынке нашей страны эти лекарственные средства в своем большинстве обладают слабовыраженным действием, представлены исключительно продукцией импортного производства и в первую очередь предназначены для осуществления гемостаза в стоматологической и оториноларингологической практике.

Результаты сравнительной оценки применяемых для интраоперационной остановки кровотечений гемостатических средств, их эффективности, «агрессивности» по отношению к тканям в месте применения, доступности и коммерческой стоимости послужили основанием для разработки нового отечественного гемостатического средства локального действия. Этот местный гемостатик должен предназначаться для проведения оперативных вмешательств в условиях диффузной кровоточивости тканей, включая операции на паренхиматозных органах. Такое средство было разработано в отделе экспериментальной медицины и фармации УП «ЛОТИОС» Департамента фармацевтической промышленности Минздрава Республики Беларусь под руководством проф. В. Н. Гапановича. При положительных результатах экспериментальных и клинических исследований планируемое в РУП «Белмедпрепараты» производство нового

местного гемостатика позволит полностью удовлетворить потребности лечебно-профилактических учреждений республики в кровоостанавливающих средствах.

Цель исследования: изучить гемостатические свойства лекарственного средства Гамастат при экспериментальном паренхиматозном кровотечении на фоне системной гипокоагуляции.

Материалы и методы

Все исследования по оценке целевых гемостатических свойств «Гамастата» выполнены с учетом нормативных требований, содержащихся в руководствах по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [4, 7].

Для изучения гемостатической активности и выявления возможных системных токсических эффектов последствие Гамастата использовали 38 крыс линии Вистар обоего пола в возрасте 2–2,5 месяцев с массой тела 230 ± 25 г. Животные были разделены на три серии: первая (контрольная, $n = 10$) – крысы с травмой печени без применения гемостатических средств, вторая (сравнения, $n = 10$) – животные с травмой печени и применением коммерческого гемостатического средства висколат («Ultradent», США) и третья (опытная, $n = 10$) – крысы с травмой печени и применением гемостатического средства Гамастат (экспериментальная; с. 100211, УП «ЛОТИОС»). Еще одну группу крыс ($n = 8$) составили животные, являющиеся интактным контролем.

За 30 минут до оперативного вмешательства крысам трех экспериментальных серий внутримышечно вводили гепарин (5000 Ед. в 1 мл, РУП «Белмедпрепараты») в дозе 2000 Ед/кг. Затем животных вводили в наркоз, осуществляли депиляцию волосяного покрова поверхности живота. После верхнесрединной лапаротомии в рану выводили правую долю печени и осуществляли краевую резекцию части органа размером $1,8 \times 0,9 \times 0,4$ см. Данное вмешательство сопровождалось обильным паренхиматозным кровотечением. У животных опытной серии и серии сравнения после просушивания раны марлевым тампоном на нее из шприца наносили гемостатические средства в объеме, необходимом для достижения полной остановки кровотечения. После осуществления гемостаза и последующего контроля его полноты в течение 10–15 минут операционная рана на брюшной стенке ушивалась наглухо. Величину кровопотери определяли по разнице веса марлевого тампона на электронных весах («Mettler-Toledo Scale & System Ltd», Китай) до и после остановки кровотечения, время наступления которой фиксировали.

Наблюдение за экспериментальными животными осуществляли в течение семи суток после применения гемостатических средств. Через определенные интервалы времени (на третьи и седьмые сутки) производилось выключение животных из эксперимента и взятие образцов крови (из аксиллярного сплетения) для исследования.

Величину гематокрита, уровень гемоглобина, количество форменных элементов крови и ряд производных гематологических показателей исследовали с помощью анализатора крови «Celltac» («Nihon Kohden», Япония). Биохимические параметры крови экспериментальных животных исследовали с помощью автоматического биохимического анализатора A-25 Random Access Analyzer (Испания) и диагностических наборов «Biosystems» (Испания).

Исследования агрегационных характеристик форменных элементов крови проведены на анализаторе AP 2110 («SOLAR», Беларусь). Принцип метода основан на измерении светорассеяния суспензии клеток в результате их агрегации [9]. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали соль аденозинтрифосфорной кислоты (АДФ; «Sigma», США) в конечной концентрации 5 мкМ. Агрегирующим агентом эритроцитов служил 0,05% раствор альциана синего («AppliChem», Германия) [3, 6, 9].

Состояние плазменного звена гемостаза оценивали унифицированными методами, позволяющими охарактеризовать основные фазы свертывающего процесса: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ) и содержание фибриногена (ФГ) [1]. Хронометрические показатели измерялись на анализаторе коагуляции СТ 2410 («SOLAR», Беларусь) с использованием реагентов НПО «Ренам» (Россия). Мануальными методами определяли растворимые комплексы мономеров фибрина (РФМК) ортофенантролиновым тестом (О-ф) и зуглобулиновый фибринолиз (ЭФ).

Статистический анализ проводился путем вычисления групповой средней арифметической и стандартной ошибки среднего. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета программ статистической обработки «Sigma Plot» и «Microsoft Excel». Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при значении $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В серии крыс без применения гемостатических средств гемостаз либо вовсе не наступал ($n = 2$), что приводило к летальному исходу непосредственно на операционном столе, либо был неполноценным, достигался в среднем за $4513,3 \pm 63,6$ с, сопровождаясь гибелью животных ($n = 3$) в течение первых 8 часов эксперимента (на вскрытии у всех крыс выявлен выраженный гемоперитонеум, величина кровопотери составляла $10,0 \pm 0,4$ г). В течение 1 суток эксперимента отмечалась 100% летальность животных в контрольной серии.

У животных серии сравнения после применения висколата раневая поверхность печени приобретала темно-коричневую окраску, образовывалась пленка, под которой постепенно формировался сгусток. В среднем время остановки кровотечения составило

Оригинальные научные публикации

Таблица 1. Динамика изменения цитологических показателей крови при частичной резекции печени с предварительным внутримышечным введением гепарина

Условия эксперимента	Исследуемые показатели					
	Эритроциты, $10^{12}/л$	Гемоглобин, г/л	Гематокрит, %	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л
Интактные животные	7,55±0,22	137±3	43,1±0,9	57,2±0,9	18,2±0,3	318±2
<i>Серия сравнения (вискостат)</i>						
3 сутки после операции	4,71±0,91*	95±11*	32,7±2,4*	64,1±4,8	20,6±1,4	322±3
7 сутки после операции	6,27±0,59	127±2	39,1±0,3	63,4±5,2	20,5±5,2	324±3
<i>Опытная серия (Гамастат)</i>						
3 сутки после операции	6,57±0,23*	121±5*	37,1±1,4*	56,5±1,0	18,4±0,5	326±4*
7 сутки после операции	6,06±0,34*	116±6*	35,0±2,0*	57,9±1,3	19,1±0,5	331±2*
Условия эксперимента	Исследуемые показатели					
	Лейкоциты, $10^9/л$	Тромбоциты, $10^9/л$	MPV, фл	RDW, %		
Интактные животные	12,2±1,3	948±62	3,5±0,1	14,0±0,2		
<i>Серия сравнения (вискостат)</i>						
3 сутки после операции	19,2±2,1*	910±232	3,6±0,2	17,7±4,7		
7 сутки после операции	16,4±0,4*	1213±115*	4,0±0,2	8,4±2,2		
<i>Опытная серия (Гамастат)</i>						
3 сутки после операции	17,8±4,1	676±43*	3,8±0,3	15,5±0,4		
7 сутки после операции	16,5±1,2	1004±94	3,9±0,2	19,1±2,5*		

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с группой интактных,

** – достоверность различий по сравнению с серией сравнения (при уровне значимости $P < 0,05$).

447,5±73,8 с, величина кровопотери – 2,9±0,5 г. В большинстве случаев остановка кровотечения была неполной, из-под краев пленки просачивалась кровь, и вискостат наносили повторно в объеме 0,2–1,2 мл. При этом окончательный гемостаз наступал через 12–15 минут. Летальность в серии составила 30% и отмечалась во временном интервале 3,5–24 часа после нанесения травмы.

У крыс с использованием гемостатического средства Гамастат остановка кровотечения достигалась в среднем за 278,2±48,1 с, а величина кровопотери составила 2,0±0,3 г. На раневой поверхности также образовывалась тонкая пленка темно-коричневого цвета, под которой быстро образовывался сгусток. В единичных случаях Гамастат наносили повторно в объеме от 0,2 до 0,8 мл, при этом окончательный гемостаз наступал через 8–10 минут. Гибели животных в опытной серии в течение 7 суток послеоперационного периода не отмечено.

При исследовании динамики изменений цитологических показателей крови (табл. 1) у животных серии сравнения (с нанесением на раневую поверхность вискостата) на 3 сутки после оперативного вмешательства наблюдали статистически достоверное снижение количества эритроцитов – на 37,6%, содержания гемоглобина на – 30,7%, и уровня гематокрита на – 24,1%, по сравнению со значениями, принимаемыми за условную норму. Спустя 1 неделю после операции показатели красной крови у выживших животных этой серии имели тенденцию к восстановлению, а количество тромбоцитов достоверно превышало их содержание в крови интактных крыс на 28%.

У животных опытной серии, остановка кровотечения у которых осуществлялась гемостатическим средством Гамастат, к 3 и 7 суткам эксперимента отмечено (табл. 1) достоверное снижение количества эритроцитов – на 13,0% и 19,7%, содержания гемоглобина – на 11,7% и 15,3% и уровня гематокрита – на 13,9% и 18%, соответственно, по сравнению с крысами интактной группы. К 7 суткам после проведения резекции органа в данной серии также регистрировалось увеличение общего количества лейкоцитов – на 56,6% ($p < 0,05$).

Вместе с тем, в ходе исследований не было выявлено статистически достоверных различий между значениями регистрируемых цитологических показателей крови крыс опытной серии и серии сравнения. Выявленные сдвиги являлись следствием и укладывались в рамки компенсаторно-приспособительных реакций организма животных на осложненную кровопотерей травму печени.

При оценке сосудисто-тромбоцитарного (клеточного) звена гемостаза в раннем послеоперационном периоде (3 сутки) выявлены активация агрегации тромбоцитов (табл. 2). Так, степень и скорость агрегации тромбоцитов крови крыс опытной серии были равными 81,20% и 77,87%/мин, что выше значений, принимаемых за условную норму на 66,3% и 110,5%, соответственно. Аналогичная картина была зафиксирована у животных серии сравнения. Подобная динамика, очевидно, была обусловлена кровопотерей, происходящей в ходе оперативного вмешательства на фоне системной гипокоагуляции, что вызвало компенсаторное повышение агрегационных свойств

Таблица 2. Средние значения показателей агрегационной активности тромбоцитов крыс

Условия эксперимента	Показатели агрегации тромбоцитов		
	Степень, %	Время, с	Скорость, %/мин
Интактные животные	48,81±5,54	164,57±14,63	37,00±4,45
<i>3 сутки после операции</i>			
Серия сравнения (вискостат)	88,73±8,54*	183,00±25,52	77,40±21,26*
Опытная серия (Гамастат)	81,20±7,13*	200,00±50,65	77,87±9,23*
<i>7 сутки после операции</i>			
Серия сравнения (вискостат)	45,78±3,73	153,50±17,12	32,15±3,98
Опытная серия (Гамастат)	42,80±7,57	161,50±20,06	36,40±9,85

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с интактными животными при уровне значимости P < 0,05.

тромбоцитов в раннем послеоперационном периоде. К окончанию наблюдения (7 сутки) происходила полная нормализация значений всех агрегационных показателей в обеих экспериментальных сериях.

Исследование показателей системы плазменного (факторного) гемостаза показало (табл. 3 и 4), что на 3 сутки после оперативного вмешательства отмечалось повышение коагуляционной активности факторов протромбинового комплекса и увеличение количества фибриногена по сравнению со значениями, регистрируемыми в группе интактных животных. Данные изменения обычно бывают связаны с реакцией свертывающей системы крови на повреждение печени, кровопотерю и развивающийся вследствие этого компенсаторный процесс. В этот же временной период было зарегистрировано увеличение значений показателя тромбинового времени относитель-

но уровня, принимаемого за условную норму, что, вероятно, обусловлено влиянием гепарина.

Анализ динамики выявленных сдвигов не выявил статистически достоверных различий между экспериментальными сериями. На 7 сутки после операции в серии крыс с применением вискостата уровень фибриногена оставался повышенным, тогда как после нанесения на раневую поверхность Гамастата значения данного показателя статистически достоверно не отличались от таковых в группе интактных животных. Данный факт может свидетельствовать о том, что Гамастат более эффективно купировал воспалительную реакцию, способствуя быстрому заживлению раны.

По остальным показателям системы плазменного гемостаза регистрировалась нормокоагуляция на протяжении всего периода наблюдений.

Таблица 3. Средние значения хронометрических показателей плазменного гемостаза

Условия эксперимента	Исследуемые показатели			
	АЧТВ, с	ПВ, с	АФПК, %с	ТВ, с
Интактный контроль	19,6±0,6	20,7±0,3	49,3±1,1	24,6±0,8
<i>3 сутки после операции</i>				
Серия сравнения (вискостат)	18,5±0,6	19,5±0,5	57,3±2,1*	30,2±0,8*
Опытная серия (Гамастат)	18,1±0,7	22,2±2,0	50,6±7,6	28,3±0,6*
<i>7 сутки после операции</i>				
Серия сравнения (вискостат)	18,0±0,5	19,8±0,8	56,4±3,5	26,0±2,2
Опытная серия (Гамастат)	17,8±1,4	19,8±0,8	56,9±3,7	26,5±0,6

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с интактными животными при уровне значимости P < 0,05.

Таблица 4. Средние значения показателей плазменного гемостаза

Условия эксперимента	Исследуемые показатели		
	Фибриноген, г/л	ЭФ, мин	О-ф, г/л x 10 ⁻²
Интактный контроль	2,5±0,2	68,5±1,5	3,6±0,1
<i>3 сутки после операции</i>			
Серия сравнения (вискостат)	5,1±0,7*	75,0±2,9	4,2±0,2
Опытная серия (Гамастат)	4,6±0,7*	73,3±6,0	4,2±0,2
<i>7 сутки после операции</i>			
Серия сравнения (вискостат)	3,7±0,4*	73,8±3,1	3,9±0,1
Опытная серия (Гамастат)	3,4±1,0	68,8±2,4	3,6±0,1

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с интактными животными при уровне значимости P < 0,05.

□ Оригинальные научные публикации

Выводы

1. Разработанное лекарственное средство Гама-стат обладает выраженной гемостатической активностью в условиях остановки кровотечения из раны печени в эксперименте на фоне системной гипокоагуляции.

2. Фармакотерапевтический эффект применения Гамастата наиболее отчетливо проявляется в сокращении времени достижения окончательного гемостаза, уменьшении величины интраоперационной кровопотери.

3. При использовании Гамастата в условиях экспериментальной модели паренхиматозного кровотечения из печени на фоне гипокоагуляции не отмечено системных эффектов последствия в отношении цитологических показателей крови, а также основных параметров сосудисто-тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза.

Литература

1. Баркаган, З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: «НьюДиамед», 2001. – 296 с.

2. Гаин, Ю. М. Неотложная хирургия органов брюшной полости: избранные лекции для студентов медицинских ВУЗов: учебное пособие. – Минск: БелАКК, 2004. – 284.

3. Люсов, В. А., Белоусов Ю. Б., Савенков М. П. К методу определения агрегации тромбоцитов и эритроцитов // Лаб. Дело. – 1976. – № 8. – С. 463–467.

4. Надлежащая лабораторная практика Республики Беларусь (ТКП 125–2008 от 1.05.2008; постановление МЗ РБ № 56 от 28.03.2008).

5. Сабиров, Ш. Р. Органосохраняющие принципы гемостаза при повреждениях паренхиматозных органов (печени, селезенки, почки): Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2006. – 18 с.

6. Создание лабораторного комплекса для тромбоцитарной агрегатометрии / А. Б. Чещевик [и др.] // Матер. научн.-практ. конф. «Проблемы и перспективы использования методов тромбоцитарной агрегатометрии в клинической практике». – Минск, 2000. – С. 5–6.

7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей редакцией проф. Р. У. Хабриева. – М.: «Медицина», 2005. – 832 с.

8. Чардаров, Н. К., Багмет Н. Н., Скипенко О. Г. Местные гемостатики в хирургии печени // Хирургия. – 2009. – № 2. – С. 18–23.

9. Born, G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and it's reversal // Nature, 194. – 927. – 1962. – 68 p.