

## **Сравнительная оценка изменения основных параметров состояния свертывающей системы крови при применении гемостатического средства Алюстат в эксперименте**

*Тагиева Ф. Р.<sup>1</sup>, Гапанович В. Н.<sup>2</sup>, Мельнова Н. И.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Государственное предприятие «Научно-практический центр ЛОТИОС»,  
г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>3</sup>Унитарное предприятие «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Свертывающая система крови или система гемостаза — одна из основных функциональных систем, способствующих сохранению постоянства внутренней среды организма. Основная ее функция заключается в предупреждении и остановке кровотечения, обеспечении восстановления целостности сосудистой стенки, поддержании кровотока и объема циркулиру-

ющей крови, сохранении ее физических и биологических свойств. При воздействии на организм человека и животных различных экстремальных факторов, включая физическое повреждение, воспалительные процессы и др., нарушается баланс между про- и антикоагулянтной (профибринолитической) системами, что проявляется гипер- или гипокоагуляционными изменениями крови [2, 3].

**Ключевые слова:** свертывающая система крови, остановка кровотечения, повреждения сосудов, гемостатическое средство Алюстат, экспериментальные животные.

**Введение.** Данная статья посвящена изучению влияния гемостатического средства местного действия Алюстат [1] на систему гемостаза экспериментальных животных (кроликов) с его применением для остановки кровотечения при моделировании десневого разреза. В ходе исследования изучались основные показатели как первичного (клеточного), так и вторичного (плазменного, факторного) гемостаза, которые позволяли судить о системных эффектах последствия нового лекарственного средства.

**Цель работы** — проведение сравнительного анализа системного влияния на ряд параметров сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза в условиях моделирования десневого разреза у кроликов.

**Материалы и методы.** Выбор объектов исследования основывался на комплексе требований, предъявляемых Министерством здравоохранения Республики Беларусь к доклиническому этапу разработки лекарственных средств в соответствии с базовыми принципами Надлежащей лабораторной практики (GLP) [2], что и определило использованные в настоящей работе методы и методические приемы.

Объектом исследования явились гемостатическое средство местного действия Алюстат [1]; средство сравнения Капрамин («ВладМива», Российская Федерация); кролики, ( $n = 66$ ); кровь лабораторных животных. Предметом исследования явились медико-биологические свойства гемостатического средства местного действия Алюстат. С учетом предъявляемых требований к объему доклинических испытаний безопасности разрабатываемых лекарственных средств сравнительное изучение целевых гемостатических свойств Алюстата при развивающемся на фоне моделируемого десневого разреза кровотечении проведено в ходе экспериментов на кроликах со средством сравнения Капрамин. Все животные были разделены на серии — контрольную ( $n = 22$ ), кровотечение в которой прекращалось самопроизвольно, без применения гемостатических средств; сравнения ( $n = 22$ ), животным которой для достижения гемостаза применяли коммерческое гемостатическое средство Капрамин («ВладМива», Российская Федерация), и опытную ( $n = 22$ ), в которой исследовали гемостатические свойства наносимого на раневую поверхность Алюстата [1; 3; 5].

Животным серии сравнения и опытной серии непосредственно после моделирования десневого разреза наносили кровоостанавливающие средства на кровоточащую поверхность из шприца в объеме 0,2 мл.

Животные находились под ежедневным наблюдением в течение 30 суток после операции с оценкой общего состояния (внешний вид, поведенческие реакции, отношения к еде). Выключение из эксперимента проводили в зависимости от его этапа: на 1; 3–4; 7–8; 10–11; 14–15 и 30 сутки с забором крови в том числе для оценки параметров первичного и вторичного гемостаза. Кровь у животных брали в пластиковые (полистерол) центрифужные пробирки из краевой вены уха (после обработки поверхности кожи 70%-м этиловым спиртом и высушивания).

В качестве антикоагулянта для исследования системы гемостаза использовали 3,8%-й раствор натрия цитрата (в соотношении 1:9).

В зависимости от цели исследования при стандартизованных режимах центрифугирования получали компоненты крови — плазму как богатую тромбоцитами, так и бестромбоцитную. При невозможности немедленного использования полученную плазму замораживали и хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более двух недель.

Исследования агрегационных свойств форменных элементов крови проведены на анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 («Солар», Беларусь), в основе работы которого лежит метод светорассеяния, предложенный Борном. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали соль аденозиндифосфорной кислоты (АДФ; Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкМ.

Плазменное звено системы гемостаза исследовано с учетом всех фаз свертывающего процесса: I фаза — активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, с), II фаза — протромбиновое время (ПВ, с), III фаза — тромбиновое время (ТВ, с); также определяли количество фибриногена

(Ф-г). Хронометрические значения показателей измеряли на коагулометре СТ 2410 «Солар» (Беларусь) с использованием реагентов ОДО «Ренам» (Россия) [2, 3, 5].

Кроме того, на основании результатов этанолового и протаминасульфатного тестов судили о наличии в плазме крови растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), являющихся подтверждением появления в крови активированных факторов свертывания и тромбина [2, 3, 4, 5].

**Результаты и их обсуждение.** Результаты изучения плазменного (факторного, вторичного) звена системы гемостаза приведены в таблицах 1, 2.

Как показало исследование, после десневого разреза у животных контрольной, опытной и серии сравнения на 1 сутки после операции отмечалось повышение уровня фибриногена по сравнению с исходными данными на 27,0; 40,0 и 44,0 % соответственно, что, по-видимому, могло быть связано с развитием воспалительной реакции на травму.

Таблица 1 — Динамика показателей плазменного звена системы гемостаза кроликов при исследовании фармакодинамики Алюстата

Показатель	Условия эксперимента						
	Исходные данные	1-е сутки после операции	3–4-е сутки после операции	7–8-е сутки после операции	10–11-е сутки после операции	14–15-е сутки после операции	30-е сутки после операции
<i>Контрольная серия</i>							
АЧТВ, с	26,7 ± 1,6	24,0 ± 2,0	23,1 ± 1,4	22,2 ± 1,0	22,4 ± 1,1	22,0 ± 1,1	24,7 ± 0,6
ПВ, с	8,3 ± 0,2	7,9 ± 0,2	7,9 ± 0,3	8,1 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,6 ± 0,2	6,0 ± 1,2*
ТВ, с	17,4 ± 0,5	16,5 ± 0,5	17,4 ± 0,8	16,7 ± 0,5	18,5 ± 0,7	14,1 ± 0,3*	15,6 ± 0,7
Фибриноген, г/л	2,6 ± 0,2	3,3 ± 0,2*	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,0 ± 0,3
ЭФ, мин	137,7 ± 5,4	150,4 ± 6,4	127,2 ± 6,7	142,5 ± 2,8	140,6 ± 5,6	118,9 ± 6,3	126,7 ± 4,4
<i>Опытная серия (Алюстат)</i>							
АЧТВ, с	21,7 ± 0,9	21,5 ± 0,8	25,8 ± 0,7*	20,3 ± 1,0	22,4 ± 1,0	21,9 ± 0,6	22,6 ± 0,7
ПВ, с	8,0 ± 0,1	8,2 ± 0,2	7,9 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,8 ± 0,2* <sup>***</sup>	8,6 ± 0,1	8,1 ± 0,1
ТВ, с	17,3 ± 0,4	16,2 ± 0,4	18,6 ± 0,5	16,9 ± 0,8	17,5 ± 0,8	18,6 ± 0,6**	19,3 ± 0,3
Фибриноген, г/л	2,5 ± 0,1	3,5 ± 0,2*	2,7 ± 0,2	3,3 ± 0,1*	3,1 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1
ЭФ, мин	141,8 ± 3,8	144,4 ± 4,0 <sup>***</sup>	142,9 ± 3,7 <sup>***</sup>	136,5 ± 4,8 <sup>***</sup>	120,7 ± 5,3* <sup>***</sup>	132,2 ± 5,2	144,3 ± 3,5 <sup>**</sup>
<i>Серия сравнения (Капрамин)</i>							
АЧТВ, с	22,4 ± 0,8	25,4 ± 1,2	23,8 ± 1,2	23,6 ± 1,0	24,5 ± 1,0	22,0 ± 1,0	23,7 ± 2,2
ПВ, с	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,9 ± 0,2	7,9 ± 0,1	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,6
ТВ, с	17,0 ± 0,5	16,2 ± 0,5	16,9 ± 0,8	18,6 ± 1,1	17,4 ± 1,8	19,0 ± 0,7 <sup>**</sup>	17,3 ± 1,3
Фибриноген, г/л	2,5 ± 0,1	3,6 ± 0,2*	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,4*	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,9 ± 0,2
ЭФ, мин	149,5 ± 3,5	163,7 ± 2,7*	164,5 ± 3,4* <sup>**</sup>	174,1 ± 2,8* <sup>**</sup>	152,5 ± 6,4	151,4 ± 3,9 <sup>**</sup>	159,3 ± 2,5 <sup>**</sup>

\* Статистически достоверно по сравнению с исходными данными по t-тесту Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ .

\*\* Статистически достоверно по сравнению с животными контрольной серии по критерию Тьюки при уровне значимости  $p < 0,05$ .

\*\*\* Статистически достоверно по сравнению с животными серии сравнения по критерию Тьюки при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Активация факторов I фазы сохранялась у кроликов на протяжении 15 суток. У части экспериментальных животных в крови определялось наличие циркулирующих растворимых фибрин-мономерных комплексов (судя по результатам этанолового и протаминасульфатного тестов), которые также подтверждали появление в крови активированных факторов свертывания крови и тромбина. На

15-е сутки наблюдения очевидно развилась вторая волна воспалительного процесса, что сопровождалось повышением содержания фибриногена, активацией III (ТВ) фазы плазменного гемостаза и наличием в крови РФМК. К 30 суткам эксперимента у кроликов контрольной серии наблюдалась нормализация плазменных показателей коагуляции.

Таблица 2 — Динамика этанолового и протаминасульфатного тестов у кроликов при исследовании фармакодинамики Алюстата

Показатель	Условия эксперимента						
	Исходные данные	1-е сутки после операции	3–4-е сутки после операции	7–8-е сутки после операции	10–11-е сутки после операции	14–15-е сутки после операции	30-е сутки после операции
<i>Контрольная серия</i>							
Этаноловый тест	100 % отр.	25 %+	29 %+	44 %+	100 % отр.	16 %+	100 % отр.
Протамин-сульфатный тест	100 % отр.	100 % отр.	14 %+	28,5 %+	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.
<i>Опытная серия (Аюстат)</i>							
Этаноловый тест	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	12,5 %+	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.
Протамин-сульфатный тест	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.
<i>Серия сравнения (Капрамин)</i>							
Этаноловый тест	100 % отр.	36 %+	12,5 %+	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.
Протамин-сульфатный тест	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.	100 % отр.

У животных серии сравнения, которым десневой разрез обрабатывали капрамином, концентрация фибриногена на 3-и и 7-е сутки наблюдения продолжала оставаться выше исходных значений, что, вероятно, также связано с развитием воспаления на моделируемую патологию. В эти же сроки наблюдения отмечалось снижение фибринолитической активности плазмы крови. Так, время эгглюбулинового лизиса увеличилось на 9,5 и 10 % в 1-е и 3-и сутки эксперимента по сравнению с исходными значениями и на 16 % — на 7-е сутки эксперимента. Известно, что снижение фибринолитической активности при повышенном уровне фибриногена в плазме крови в организме чревато развитием тромботического состояния. На 1-е сутки исследования наблюдалось снижение на 13,4 % активности факторов протромбиназообразования (удлинение АЧТВ) и наличие в крови у части животных растворимых фибрин-мономерных комплексов, которые регистрировались в течение первой недели исследований. Протромбиновое время, начиная с 7-х по 15-е сутки, увеличилось на 4 % по отношению к исходным данным. Такое состояние коагуляционных факторов свидетельствует о тромбинемии и потреблении факторов I фазы коагуляции.

При изучении коагуляционного статуса животных, остановку кровотечения у которых осуществляли с помощью ЛС аюстат, отмечалось повышение уровня фибриногена на 1, 7 и 10-е сутки и удлинение АЧТВ (на 18,9 %) на 3-и сутки после операции. Однако в других показателях плазменного гемостаза кроликов данной серии изменений в первую неделю эксперимента практически не наблюдали.

Только на 11-е сутки исследования было зарегистрировано усиление фибринолитической активности плазмы крови на 15 % относительно исходных значений. Растворимые фибрин-мономерные комплексы в 100 % случаев на всех сроках исследования у животных данной опытной серии не определялись, что указывало на отсутствие активации свертывающей системы крови.

Результаты изучения клеточного (первичного; тромбоциты) звена системы гемостаза приведены в таблице 3.

Функциональная способность исследуемых клеток оценивалась по показателям агрегатограммы: максимальной амплитуде агрегации, времени достижения максимальной агрегации и скорости агрегации на 30 с.

Исследование агрегационной способности тромбоцитов у кроликов контрольной серии показало, что после нанесения экспериментального десневого разреза в области центральных резцов отме-

чалась активация функции кровяных пластинок. Так, на 1-е сутки после операции степень агрегации тромбоцитов возросла с  $42,4 \pm 4,1$  % до  $60,1 \pm 8,6$  %, а скорость агрегационного процесса на 30 с — с  $39,6 \pm 4,5$  %/мин до  $49,5 \pm 6,1$  %/мин. Это нарастание достигало своего максимума на 3–4-е сутки после операции, когда регистрировалось статистически достоверное повышение как степени, так и скорости агрегации тромбоцитов — в данный временной интервал исследования значения изучаемых показателей агрегатограмм достигали  $71,4 \pm 9,3$  %/мин ( $p < 0,05$ ) и  $63,0 \pm 7,6$  %/мин ( $p < 0,05$ ) соответственно. В последующем (7–8, 10–11 и 14–15-е сутки после операции) степень АДФ-агрегации тромбоцитов у кроликов контрольной серии находилась в пределах от 50 % до 56 %, что незначительно превышало исходные величины, а скорость агрегации продолжала оставаться повышенной ( $p > 0,05$ ) вплоть до 10 суток эксперимента и лишь на 15-е сутки практически не отличалась от исходных значений. Что касается времени наступления максимальной амплитуды агрегации, то в течение всего периода наблюдения существенных изменений данного показателя не происходило (таблица 3).

Таблица 3 — Динамика показателей тромбоцитарного звена гемостаза у кроликов при исследовании фармакодинамики Алюстата

Показатель	Условия эксперимента					
	Исходные данные	1-е сутки после операции	3–4-е сутки после операции	7–8-е сутки после операции	10–11-е сутки после операции	14–15-е сутки после операции
<i>Контрольная серия</i>						
Степень агрегации, %	$42,4 \pm 4,1$	$60,1 \pm 8,6$	$71,4 \pm 9,3^*$	$51,0 \pm 12,6$	$56,9 \pm 11,2$	$53,3 \pm 5,0$
Время агрегации, мин	$2,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,14$	$2,1 \pm 0,1$
Скорость агрегации, %/мин	$39,6 \pm 4,5$	$49,5 \pm 6,1$	$63,0 \pm 7,6^*$	$54,8 \pm 13,3$	$51,4 \pm 10,8$	$33,4 \pm 10,2$
<i>Опытная серия (Алюстат)</i>						
Степень агрегации, %	$56,7 \pm 5,8$	$52,2 \pm 11,1$	$57,6 \pm 9,2$	$54,3 \pm 6,8$	$61,2 \pm 19,8$	$60,9 \pm 9,5$
Время агрегации, мин	$2,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,5$	$4,2 \pm 1,25$	$1,4 \pm 0,2$
Скорость агрегации, %/мин	$46,2 \pm 4,8$	$42,4 \pm 11,2$	$48,8 \pm 9,7$	$51,3 \pm 4,8$	$52,4 \pm 5,3$	$59,3 \pm 13,4$
<i>Серия сравнения (Капрамин)</i>						
Степень агрегации, %	$56,2 \pm 5,7$	$55,1 \pm 8,9$	$81,9 \pm 9,8^*$	$58,5 \pm 8,0$	$62,8 \pm 8,3$	$58,1 \pm 7,5$
Время агрегации, мин	$2,00 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
Скорость агрегации, %/мин	$59,5 \pm 7,7$	$44,00 \pm 6,8$	$76,6 \pm 9,6$	$49,9 \pm 10,4$	$55,4 \pm 7,2$	$58,6 \pm 8,2$

\* Статистически достоверно по сравнению с исходными данными по t-тесту Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Исследование функциональной способности кровяных пластинок кроликов в динамике репаративного процесса после обработки десневого разреза Капрамином показало, что на 3-и сутки после операции происходило усиление функциональной активности клеток, о чем свидетельствовало повышение всех показателей агрегатограмм по сравнению с исходными данными (до оперативного вмешательства). Однако статистически значимо повышалась только степень агрегации — с  $56,2 \pm 5,7$  % до  $81,9 \pm 9,8$  % ( $p < 0,05$ ). На 7–8-е сутки после операции у кроликов серии сравнения агрегационная способность тромбоцитов уже была близка к норме и сохранялась таковой и далее (таблица 3).

Динамика изменений функциональной способности тромбоцитов у животных опытной серии, которым осуществлялась остановка кровотечения из раневой поверхности Алюстатом, свидетельствовала о том, что при использовании в качестве гемостатического пособия при моделируемом десневом разрезе разработанного лекарственного средства, предназначенного для местного применения в стоматологической практике, на протяжении всего периода исследования после осуществления гемостаза усиления процесса активации тромбоцитов не отмечалось. Все показатели агрегатограмм (степень, время и скорость агрегации) во все временные интервалы исследований статистически

значимо не отличались от своих исходных значений, которые были зарегистрированы до оперативного вмешательства (таблица 3).

**Заключение.** Таким образом, исследования показали, что при моделировании десневого разреза в первые 3–4 суток после операции у кроликов развиваются гиперкоагуляционные нарушения в плазменном звене системы гемостаза на фоне повышения агрегационных свойств тромбоцитов, причем в большей степени у животных с самопроизвольной остановкой кровотечения. Это, вероятно, связано с развитием реактивной воспалительной реакции на альтерирующее воздействие, поскольку степень ее выраженности у кроликов контрольной серии была больше, чем в серии сравнения и опытной серии. В свою очередь у животных с применением средства сравнения отмечается более выраженное влияние на активацию агрегационной активности кровяных пластинок в сравнении с разработанным гемостатическим средством. Полученные результаты также позволяют сделать вывод об отсутствии у Алюстата способности проявлять системное действие в отношении как первичного (клеточного), так и вторичного (плазменного) звеньев гемостаза.

### Литература

1. Инструкция по медицинскому применению лекарственного средства Алюстат: согласовано с М-вом здравоохранения Респ. Беларусь № 447 от 28.04.2014, рег. удостоверение № 17/11/1587 от 14.04.2014; действительна до 14.04.2019. — Минск, 2014. — 3 с.
2. Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008 (02040). — Введ. 28.03.08. — Минск: М-во здравоохр. Респ. Беларусь, 2008. — 35 с.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р. У. Хабриева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
4. Evaluation of bleeding risk and measurement methods in dental patients / A. Cacigral [et al.] // Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. — 2010. — Vol. 15, № 6. — P. 863–868.
5. Тагиева, Ф. Р. Экспериментальная оценка медико-биологических свойств отечественного гемостатического средства местного действия Алюстат / Ф. Р. Тагиева, В. Н. Гапанович // Стоматолог. — 2016. — № 2. — С. 25–36.

## Comparative assessment of changes in the main parameters of the state of the blood coagulation system when using the hemostatic agent Alustat in the experiment

*Tagieva F. R.<sup>1</sup>, Gapanovich V. N.<sup>2</sup>, Melnova N. I.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*State Institution «The Scientific and Practical Center LOTIOS»,  
Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>3</sup>*Unitary Enterprise «Center for Expertise and Testing in Healthcare»,  
Minsk, Republic of Belarus*

The blood coagulation system or hemostasis system is one of the main functional systems that contribute to maintaining the constancy of the internal environment of the body. Its main function is to prevent and stop bleeding, ensure restoration of the integrity of the vascular wall, maintain blood flow and the volume of circulating blood, preserve its physical and biological properties. When exposed to various extreme factors, including physical damage, inflammatory processes, etc., on the human and animal organism, the balance between the pro- and anticoagulant (profibrinolytic) systems is violated, which is manifested by hyper- or hypocoagulation changes in blood coagulation [2, 3].

**Keywords:** blood coagulation system; stopping bleeding; vascular damage; hemostatic agent Alustat; experimental animals.

*Поступила 05.11.2020*