

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

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА «ГАМАСТАТ» ПРИ ПАРЕНХИМАТОЗНОМ КРОВОТЕЧЕНИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Унитарное предприятие «ЛОТИОС»¹,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

В эксперименте изучены гемостатическая активность и системные эффекты последействия нового лекарственного средства «Гамастат». 72 крысы линии Вистар были разделены на четыре серии: первая – здоровые животные («интактный контроль»), вторая – крысы с травмой печени без применения гемостатических средств («контрольная серия»), третья – животные с травмой печени и применением коммерческого лекарственного средства вискостат («Ultradent», США; «серия сравнения») и четвертая – крысы с травмой печени и применением гемостатического средства «Гамастат» («опытная серия»). Исследовали длительность кровотечения и величину кровопотери, динамику изменений цитологических и биохимических показателей крови, параметров сосудистотромбоцитарного и плазменного гемостаза. Было установлено, что лекарственное средство «Гамастат» обладает выраженной гемостатической активностью и не оказывает токсического системного воздействия.

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, V.N. Gapanovich

APPLICATION OF THE NEW HEMOSTATIC MEDICINE «GAMASTAT» AT PARENCHYMATOUS BLEEDING IN EXPERIMENT

Summary: In experiment haemostatic effectiveness and systemic effects of an after-action of new medicine «Gamastat» are studied. 72 rats of the line Vistar were divided into four series: the first – healthy animals («intact monitoring»), the second – rats with an injury of a liver without application of hemostatics («a control series»), the third – animals with an injury of a liver and application of commercial medicine «Viskostat» («Ultradent», the USA; «a comparison series») and the fourth – rats with an injury of a liver and hemostatic application «Gamastat» («experienced series»). Investigated the bleeding duration and size, dynamics of cytologic and biochemical indexes of blood, parameters of primary and coagulative hemostasis. It was established that «Gamastat» medicine possesses the expressed haemostatic activity and does not make pathological toxic systemic influence.

Keywords: hemostatics, bleeding stop.

Сособой остротой проблема гемостаза стоит в хирургии паренхиматозных органов (печени, селезенки, почки), что связано с их анатомо-топографическими и физиологическими особенностями, возросшей частотой повреждений [7], а также с увеличением количества оперативных вмешательств на этих органах [7]. Так, повреждения печени при травме живота встречаются в 32,6% случаев, селезенки – в 23-54% [4] и по частоте занимают 2-3 место среди повреждений абдоминальных органов.

Послеоперационная летальность при повреждениях селезенки достигает 33%, которая при сочетанных трав-

мах возрастает до 60% [4]. Общая летальность при ранениях и травмах печени, по данным ряда отечественных и зарубежных авторов, составляет от 20% до 40%, а в группе тяжелых травм – более 70%. Высокие цифры неудовлетворительных результатов лечения повреждений печени и селезенки в первую очередь предопределены отсутствием надежных способов гемостаза [1, 3].

В целом, проблема остановки паренхиматозных кровотечений содержит много нерешенных вопросов, что побуждает к поиску эффективных и малотравматичных способов достижения гемостаза. Некоторые из методов апробированы и применяются в клинической практике,

другие не вышли за пределы экспериментальных разработок, а их оценки разноречивы.

Основным недостатком коагуляционных методик гемостаза является образование обширной зоны некроза. Все большее интерес вызывает возможность применения для остановки кровотечения новых гемостатических лекарственных средств на основе неорганических солей, способных оказывать локальное фармакотерапевтическое действие. Однако их применение не всегда сопровождается гемостатическим эффектом необходимой силы. Одной из причин этого является то, что присутствующие на фармацевтическом рынке нашей страны лекарственные средства для местного применения в своем большинстве обладают слабовыраженным и непродолжительным целевым действием (к тому же, преимущественно ориентированы на стоматологическую практику).

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 экспериментального изучения нового гемостатического средства локального действия «Гамастат», предназначенного для проведения кровосберегающих и органосохраняющих оперативных вмешательств на паренхиматозных органах. Это средство разработано в отделе экспериментальной медицины и фармации УП «ЛОТИОС» Департамента фармацевтической промышленности Минздрава Республики Беларусь под руководством проф. В.Н. Гапановича. С учетом результатов проведенных экспериментальных и клинических исследований несомненно, что организация производства нового гемостатического средства позволит полностью удовлетворить потребности лечебно-профилактических учреждений республики в лекарственных средствах данной группы, способствуя улучшению качества оказания помощи больным с паренхиматозными кровотечениями.

Цель исследования: изучить гемостатические свойства и определить системное токсическое действие нового лекарственного средства «Гамастат» при экспериментальном паренхиматозном кровотечении.

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 [6, 9].

Для изучения гемостатической активности и выявления возможных системных токсических эффектов последствие «Гамастата» использовали 72 крысы линии Вистар обоего пола в возрасте 2-2,5 месяцев с массой тела 230 ± 25 г. Животные были разделены на четыре серии: первая – здоровые крысы («интактный контроль»), вторая – животные с травмой печени без применения гемостатических средств («контрольная серия»), третья – животные с травмой печени и применением коммерческого лекарственного средства висколат («Ultradent», США; «серия сравнения») и четвертая – крысы с травмой печени и применением гемостатического средства «Гамастат» («опытная серия»). Операции

во всех случаях проводили под общей анестезией. После верхнесрединной лапаротомии в рану выводилась правая доля печени. Далее выполняли краевую резекцию органа размером 1,5-2x0,5 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 от 0,1 мл до 0,5 мл. После остановки кровотечения операционная рана на брюшной стенке ушивалась наглухо, и животные выводились из наркоза. Величину кровопотери определяли по разнице веса марлевого тампона на электронных весах («Mettler-Toledo Scale & System Ltd», Китай) до и после осуществления полного гемостаза.

Наблюдение за экспериментальными животными осуществляли в течение четырнадцати суток после применения гемостатических средств. Через определенные интервалы времени (на третьи, седьмые и четырнадцатые сутки) производилось выключение животных из эксперимента (эфирный наркоз), образцы крови из околосердечной сумки и тканей печени забирались 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 А-25 и диагностических наборов «Biosystems» (Испания).

Исследования агрегационных характеристик форменных элементов крови проведены на анализаторе AP 2110 («SOLAR», Беларусь), в основе работы которого лежит метод светорассеяния, предложенный Борном [10]. 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) [5, 8, 10].

Состояние системы 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) [2]. 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 эуглобулиновый фибринолиз (ЭФ).

Для проведения гистологического исследования у животных, выведенных из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки после операции, выделяли участки ткани печени в области нанесенной травмы 1,0x1,0 см, фиксировали их в 5% растворе нейтрального формалина. После спиртовой проводки и заливки в парафин срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Массона для выявления коллагеновых волокон и по Перлсу для выявления железа.

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 исследования.

В серии животных без применения гемостатических средств кровотечение останавливалось в среднем за $1712,5 \pm 242,4$ с, величина кровопотери составляла $4,0 \pm 0,4$ г.

При нанесении «Гамастата» кровь останавливалась в среднем за $262,1 \pm 36,3$ с, а величина кровопотери составляла $2,1 \pm 0,3$ г. На раневой поверхности образовывалась тонкая пленка темно-коричневого цвета, под которой быстро образовывался сгусток. В единичных случаях «Гамастат» наносили повторно, при этом окончательный гемостаз наступал через 6-8 минут.

После применения вискостата раневая поверхность приобретала темно-коричневую окраску, также образовывалась пленка, под которой постепенно формировался сгусток. В среднем время остановки кровотечения составило $330,0 \pm 24,3$ с, величина кровопотери – $3,0 \pm 0,2$ г. В случаях, когда остановка кровотечения была неполной и из-под краев пленки просачивалась кровь, вискостат наносили повторно. При этом окончательный гемостаз наступал через 10-11 минут.

Макроскопическое исследование органов брюшной полости осуществлялось с 3 по 14 сутки после операции. В ходе проведенных исследований выявлено, что в случае остановки кровотечения «Гамастатом» через 7 суток после операции между долями печени наблюдался рыхлый адгезивный процесс, который полностью исчезал к 14-м суткам; раневая поверхность была покрыта темно-коричневой пленкой и частично прикрывалась сальником, края печени не были воспалены. После нанесения на рану печени вискостата уже на 3 сутки между долями печени и желудком отмечался выраженный спаечный процесс, достигавший максимума к 7 суткам; раневая поверхность была инфильтрирована, у части крыс в области резекции доли наблюдался некротический струп. К 14 суткам спаечный процесс регистрировался только между долями печени, раневую поверхность органа обволакивал сальник.

Гистологические исследования ткани печени в области применения «Гамастата» и вискостата показали, что раневой процесс протекал одно-типно в виде сменяющих друг друга фаз травматического воспаления (1-3 сутки), образования соединительной ткани, формирования и перестройки рубца (3-14 сутки). Наносимые на рану гемостатические средства выявлялись гистологически (по железу) во все сроки исследования (рис. 1), что опосредованно указывало на избирательно локальный характер их фармакотерапевтического действия.

Снижение концентрации альбумина на 10-13% по отношению к

Таблица 1. Динамика изменения биохимических показателей в плазме крови крыс после моделирования резекции печени

Условия эксперимента	Исследуемый показатель				
	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, ммоль/л	АЛТ, У/л
Интактный контроль					
	56,5±1,2	27,5±0,2	4,9±0,2	36,2±1,8	62,7±3,8
3 сутки после операции					
Без лечения	58,5±2,0	28,5±0,8	5,3±0,5	43,9±1,7*	23,5±5,5*
Гамастат	59,9±1,1	27,6±0,9**	4,9±0,2	43,4±1,7*	55,5±1,1**
Вискостат	61,4±1,7*	23,8±0,9*	4,9±0,3	40,1±3,0	34,6±1,2*
7 сутки после операции					
Без лечения	63,8±1,1*	23,5±0,4*	4,6±0,1	42,2±0,6*	27,7±2,4*
Гамастат	64,7±1,0*,**	26,2±0,7	4,4±0,2	49,0±1,1*	33,1±2,0*,**
Вискостат	59,2±1,4	25,0±1,0	4,3±0,4	43,5±2,4*	57,7±1,9
14 сутки после операции					
Без лечения	57,2±1,4	27,3±0,8	4,4±0,1	46,0±1,2*	47,4±3,2*
Гамастат	60,4±1,6	29,1±1,3	5,0±0,2	45,2±1,4*,**	60,6±3,2
Вискостат	62,6±1,2	29,6±0,6*	4,8±0,3	36,7±2,4	64,9±2,9

Условия эксперимента	Исследуемый показатель			
	АСТ, У/л	γ-ГТ, У/л	Глюкоза, ммоль/л	Железо, мкмоль/л
Интактный контроль				
	113,8±7,0	3,6±0,5	8,1±0,4	42,9±2,7
3 сутки после операции				
Без лечения	108,5±15,9	4,3±0,3	6,9±0,4	45,5±6,4
Гамастат	89,1±3,5*	4,2±0,3	8,2±0,1	55,4±4,7*
Вискостат	93,3±2,9*	6,0±0,7*	8,4±0,3	55,2±5,7
7 сутки после операции				
Без лечения	93,8±9,7	5,8±0,7*	7,6±0,4	26,9±0,9*
Гамастат	97,6±5,9	3,9±0,4**	8,3±0,2	46,0±1,4
Вискостат	103,8±4,4	6,5±0,7*	8,1±0,5	46,4±1,3
14 сутки после операции				
Без лечения	97,5±5,4	5,5±0,4*	8,4±0,2	46,2±2,4
Гамастат	91,1±2,9*,**	3,9±0,4	9,3±0,3*	48,1±2,2**
Вискостат	107,7±2,0	4,5±0,4	9,1±0,2*	39,6±1,3

Примечание: *,** – соответственно, достоверность различий по сравнению с контрольной серией и серией сравнения при уровне значимости $P < 0,05$.

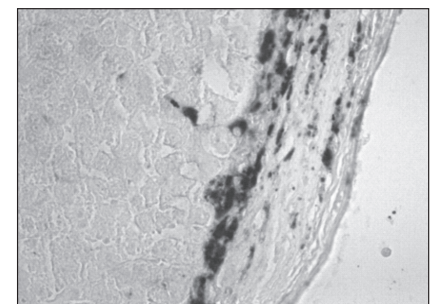


Рисунок 1. Область нанесения «Гамастата» на рану печени на 14 сутки. Реакция на железо по Перлсу положительная. Ув. 125

значениям, полученным в серии интактного контроля, регистрировалось только у животных с применением вискостата на 3-7 сутки после операции. Не было отмечено статистически достоверных изменений уровня мочевины в плазме крови. Незначительный рост содержания креатинина наблюдался в примерно в равной степени во всех экспериментальных сериях на протяжении всего периода наблюдений. Позитивный эффект, опосредованный применением гемостатических средств в ходе данного эксперимента, наиболее отчетливо выявлялся по динамике изменения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и концентрации сывороточного железа. Так, уровень АЛТ в контрольной группе без остановки кровотечения к окончанию периода наблюдений оставался сниженным на 25% по отношению к значениям, принимаемым за условную норму. При этом на 3-7 сутки после операции его уменьшение было еще более выраженным. В экспериментальных сериях с использованием гемостатических средств не отмечалось столь резких колебаний, полная нормализация данного показателя наступала к 14 суткам послеоперационного периода. С учетом того, что наибольшее количество АЛТ содержится в гепатоцитах, и, принимая во внимание особенности повышения активности трансаминазы в плазме крови при данной экспериментальной модели, подобные результаты могут свидетельствовать о протективных свойствах исследуемых гемостатических средств, а также об органосохраняющих аспектах их применения на практике.

Кровотечение, возникающее при резекции печени, приводило к заметному (на 37%, $P < 0,05$) снижению концентрации железа в плазме крови крыс контрольной серии. Оказание эффективного гемостаза в серии сравнения и опытной серии животных способствовало меньшей величине кровопотери и, как следствие – сохранению значений данного показателя на уровне близком к условной норме.

При исследовании динамики изменений цитологических показателей крови было установлено, что мо-

делируемая травма печени вызывала незначительные колебания значений показателей красной и белой крови у крыс. Вместе с тем необходимо отметить, что у животных с нанесением «Гамастата» к 14 суткам эксперимента наблюдалось достоверное снижение среднего объема эритроцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците не более чем на 12%, а в серии сравнения (с нанесением вискостата) данные показатели были статистически достоверно ниже уровня условной нормы на протяжении всего периода наблюдений.

В ходе оценки фармакодинамики нового лекарственного средства, с учетом особенностей его целевых фармакотерапевтических свойств особое внимание было уделено оценке сдвигов при моделируемой патологии со стороны показателей первичного и вторичного гемостаза.

При оценке сосудисто-тромбоцитарного гемостаза было установлено, что средние значения показателя степени агрегации тромбоцитов во всех экспериментальных сериях на протяжении всего периода наблюдений статистически достоверно не отличались от уровня, принимаемого за условную норму, т.е. от значений, регистрируемых у интактных животных. К 14 суткам в серии крыс с остановкой кровотечения «Гамастатом» наблюдалось некоторое снижение начальной скорости агрегации – на 58,6% по отношению к значениям, полученным в серии интактного контроля, и на 52,3% – в контрольной серии. Тенденция к снижению скорости агрегации отмечалась и в серии сравнения.

Исследование агрегационных свойств эритроцитов показало (таблица 2), что через 3 суток после операции без нанесения гемостатических средств агрегационная активность эритроцитов крыс статистически достоверно повышалась относительно значений, полученных в серии интактного контроля: степень агрегации – на 40%, скорость агрегации – на 54%.

Нанесение на раневую поверхность «Гамастата» не приводило к изменению агрегационных показателей.

Использование вискостата, напротив, снижало степень агрегации эритроцитов в среднем на 22,8%. В последующие сроки наблюдения не выявлено изменений основных показателей, характеризующих процесс агрегации эритроцитов. Отмечавшееся на 7 и 14 сутки повышение начальной скорости агрегации не сопровождалось изменением значения степени агрегации, и не влияло на время агрегационного процесса.

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение «Гамастата» при остановке экспериментального кровотечения из печени в целом не оказывало системного действия на агрегационную способность тромбоцитов и эритроцитов.

Исследование показателей системы плазменного гемостаза показало, что во всех экспериментальных сериях на 3 сутки после резекции отмечалось незначительное повышение уровня фибриногена относительно значений, полученных в серии интактного контроля. Данный факт можно рассматривать как реакцию организма на повреждение печени. В контрольной группе

Таблица 2. Средние значения показателей агрегационной активности эритроцитов крыс

Условия эксперимента	Показатели агрегации эритроцитов		
	Степень, %	Время, с	Скорость, %/мин
Интактный контроль			
	53,00±2,53	582±7	11,28±0,87
3 сутки после операции			
Без лечения	74,13±4,10*	592±2	16,60±0,69*
Гамастат	61,60±2,19	599±1	13,10±1,48
Вискостат	40,90±3,66*	595±5	8,76±1,54
7 сутки после операции			
Без лечения	53,95±7,75	594±5	14,90±0,70*
Гамастат	55,70±2,65	566±12	17,33±0,68
Вискостат	57,12±2,11	593±6	13,68±1,58
14 сутки после операции			
Без лечения	58,71±1,76	577±8	11,10±0,71
Гамастат	62,10±3,39	592±4	16,23±1,34
Вискостат	67,66±1,55	588±4	15,68±1,20

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контрольной серией при уровне значимости $P < 0,05$.

животных (без нанесения гемостатиков) регистрировалось повышение уровня РФМК, что указывало на гиперкоагуляцию. В последующем во всех экспериментальных сериях не было выявлено статистически значимых отличий по всем изученным показателям плазменного гемостаза по сравнению со значениями, принимаемыми за условную норму.

Таким образом, проведенное исследование показало, что гемостатическое средство «Гамастат», так же, как препарат сравнения вискостат, при остановке экспериментального кровотечения из печени не оказывали системных эффектов на показатели плазменного (вторичного) гемостаза.

Выводы

Разработанное лекарственное средство «Гамастат» обладает выраженной гемостатической активностью в условиях остановки кровотечения из раны печени в эксперименте.

Позитивный фармакотерапевтический эффект применения «Гамастата» наиболее отчетливо проявляется в сокращении времени достижения окончательного гемостаза, уменьшении величины интраоперационной кровопотери и протективном влиянии на выраженность цитолитического действия раневого процесса.

Динамика изменения цитологических и биохимических показателей крови свидетельствует об отсутствии негативных эффектов последствия после применения «Гамастата» в условиях экспериментальной модели паренхиматозного кровотечения из печени.

При использовании «Гамастата» не выявлено патологического системного воздействия на показатели плазменного гемостаза и агрегационные характеристики тромбоцитов и эритроцитов крови экспериментальных животных.

Нанесение «Гамастата» на рану печени не оказывает в эксперименте отрицательного влияния на печеночную паренхиму и не задерживает в области применения репаративные процессы.

Литература

1. Алимов, А.Н., Исаев А.Ф., Сафронов Э.П., Отлыгин Ю.В., Усейнов Э.Б. Органосохраняющий метод лечения разрыва селезенки // Хирургия. – 2005. – №10. – С. 55-60.
2. Баркаган, З.С., Момот А.П. – Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: «Ньюдиамед», 2001. – 296 с.
3. Бунатян, А.Г., Завенян З.С., Багмет Н.Н. Проблемы гемостаза и герметизма при резекциях печени с использованием фибрин-коллагеновой субстанции // Хирургия. – 2003. – №9. – С. 18-23.
4. Гаин, Ю.М. Неотложная хирургия органов брюшной полости. – Минск, 2004.
5. Люсов, В.А., Белоусов Ю.Б., Савенков М.П. К методу определения агрегации тромбоцитов и эритроцитов. // Лаб. Дело. – 1976, № 8. – С. 463-467.
6. Надлежащая лабораторная практика Республики Беларусь (ТКП 125-2008 от 1.05.2008; постановление МЗ РБ №56 от 28.03.2008).
7. Сабиров, Ш.Р. Органосохраняющие принципы гемостаза при повреждениях паренхиматозных органов (печени, селезенки, почки): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2006. – 18 с.
8. Создание лабораторного комплекса для тромбоцитарной агрегатометрии / А.Б. Чещевик [и др.] // материалы научно-практ. Конф. «Проблемы и перспективы использования методов тромбоцитарной агрегатометрии в клинической практике», г. Минск, 2000. – С. 5-6.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей редакцией проф. Р.У. Хабриева. – М.: «Медицина», 2005. – 832 с.
10. Born, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // Nature, 194. – 927, – 1962. – 68 p.

Поступила 6.02.2013 г.