

Эффективность нового гемостатического средства «Фибриностат» в опытах IN VITRO и IN VIVO

1Государственное учреждение «432 главный военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь» г. Минск

2Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии» г. Минск

Проблема эффективного местного гемостаза при паренхиматозных кровотечениях является чрезвычайно актуальной [7].

Весьма сложным является осуществление гемостаза при хирургических вмешательствах на паренхиматозных органах, их травматическом повреждении, особенно при нарушениях в системе гемостаза. В нашей стране отсутствует промышленное производство местных гемостатиков, удовлетворяющих потребности практического здравоохранения. Существующие же импортные препараты малодоступны из-за их дороговизны. Отдельной строкой следует очертить эту проблему для военно-полевой хирургии, а также чрезвычайных ситуаций военного и мирного времени [4-8].

Нарушения гемостаза при различных состояниях и заболеваниях организма (травмы, оперативные вмешательства, род-ы, болезни крови, печени, гемморрагические диатезы, ДВС- синдроме) могут быть обусловлены изолированным или совместным расстройством сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного механизмов остановки кровотечений. В зависимости от поражения того или иного компонента системы гемостаза (или их различного сочетания), клиническая картина гемморрагических проявлений и тактика врача в борьбе с кровоточивостью будут разными [1-3, 9-11].

В настоящее время в арсенале гемостатических средств имеются препараты местного действия – сухая плазма, тромбин, гемостатическая губка и др. Однако их применение не всегда оказывает гемостатический эффект необходимой силы, а в некоторых случаях чревато возникновением вторичного кровотечения. Одной из причин этого является то, что известные препараты для местного применения в своем большинстве обладают слабовыраженным и непродолжительным целевым действием. Кроме того, применение порошкообразных и аппликационных препаратов из донорской плазмы при профузных паренхиматозных кровотечениях по ряду причин малоперспективно, как в плане оказания специфических лечебных свойств, так и целесообразности их использования в целом, – из-за ограниченности проявления гемостатического действия средствами данного класса, смываемого током крови с раневой поверхности [12].

Вышеизложенное определяет необходимость разработки нового гемостатического препарата локального действия, обладающего выраженным гемостатическим эффектом. Таким препаратом является лекарственное средство «Фибриностат», разработанное в лаборатории экспериментальной патологии и трансфузиологии ГУ «РНПЦГТ МЗ РБ» (г. Минск).

Новое средство состоит из растворов фибриногена и тромбина. По механизму действия он дублирует конечную стадию естественного каскада свертывания плазмы, которая заключается в образовании из растворимого плазменного белка фибриногена фибринового сгустка который останавливает кровотечение [9].

Эффективность «Фибриноста» заключается в том, что образование сгустка происходит не на поверхности печени, как у других гемостатиков, а уже на выходе, то есть интравазально. Это дает возможность его использования у больных с нарушениями в системе гемостаза.

Еще одним преимуществом «Фибриноста» является ускорение регенеративного процесса и послеоперационной эпителизации раневой поверхности [13].

Цель исследования

Экспериментальная оценка целевых свойств и фармакодинамики нового гемостатического средства «Фибриностат» при parenхиматозном кровотечении, а так же выявление системных эффектов последействия.

Материалы и методы

В рамках изучения целевых свойств нового гемостатического средства местного действия был проведен сравнительный анализ коагуляционной активности тромбина и качества фибриногена входящих в состав «Фибриноста» и импортного аналога «Тиссукол кит», Baxter (Австрия) в экспериментах *in vitro*. В эксперименте применялся ручной коагуляционный метод, который проводился на водяной бане и заключался в визуальном определении промежутка времени от добавления стартового реактива (тромбина) до момента выпадения фибрина.

Для изучения фармакодинамики и выявления системных эффектов последействия «Фибриноста» использовали 50 беспородных белых крыс обоих полов с массой тела 230 ± 25 г.. Животные были разделены на четыре группы: первая группа – животные без каких-либо повреждений и вмешательств («интактный контроль»), вторая группа – животные с травмой печени без применения гемостатических средств («контрольная группа»), третья группа – животные с травмой печени и применением «Тиссукола» - препарата сравнения - в качестве кровоостанавливающего средства («группа сравнения»), четвертая группа – животные с травмой печени и применением композиционного гемостатического средства «Фибриностат» («опытная группа»). Операции во всех случаях проводили под общей анестезией. Крысы вводились в состояние общей анестезии путем инъекции в брюшную полость 0,3 мл реланиума и 0,4 мл калипсола. После верхнесрединной лапаротомии, в рану выводилась левая доля печени. Далее выполняли стандартную клиновидную резекцию в области левой доли печени размером 10 x 5 мм. В контрольной группе животных гемостаз наступал самопроизвольно после прижата раны марлевым шариком. Животным групп сравнения и опытных серий на кровоточащую поверхность из шприца послойно наносили «Тиссукол» (препарат-аналог) и «Фибриностат», соответственно. После чего края раны сводились и удерживались течение 3-5 мин, в ходе которых они прочно склеивались. Через 15 мин. после остановки кровотечения операционная рана ушивалась наглухо и животные выводились из наркоза.

Наблюдение за экспериментальными животными осуществляли в течение семи суток после применения препарата. Через определенные интервалы времени (на первые, третьи и седьмые сутки) животным производился забор образцов крови путем пункции перикарда для лабораторного исследования. Для получения базовых результатов забор крови, так же производили у 5 животных без нанесения какой либо травмы («интактный контроль»).

Величину гематокрита, уровень гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и ряд других расчетных параметров клеточного состава крови исследовали с помощью анализаторов крови F-800 «Sysmex» (Япония) и COULTER® AC T diff TM (США).

Содержание общего белка оценивали по методу связывания с красителем Понсо С (Sigma, США), альбумина – по его связыванию с красителем бромкрезоловым зеленым (БКЗ, США). Концентрацию мочевины определяли диацетилмонооксимным методом. Детекцию активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) осуществляли колориметрическими методами.

Изучение системы вторичного гемостаза осуществляли унифицированными методами, позволяющими охарактеризовать основные фазы свертывающего процесса: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ) и содержание фибриногена (ФГ). Исследование проводилось на анализаторе гемокоагуляции CGL 2110 (ОАО “Солар”, Беларусь).

Результаты и обсуждение

1. Сгусткообразующая активность в опытах *in vitro*

В результате оценки коагуляционной активности тромбина и качества фибриногена, входящих в состав «Фибриностата» и «Тиссукол кит», Вахтер (Австрия) *in vitro* зафиксированы практически идентичные результаты. Плотный сгусток образовывался примерно за одно и то же время – $5,8 \pm 0,17$ и $4,8 \pm 0,16$ с. соответственно, что свидетельствует о выраженной сгусткообразующей способности «Фибриностата» (таблица 1).

Таблица 1. Коагуляционная активность разрабатываемого гемостатического средства «Фибриностата» и аналога «Тиссукол кит», Вахтер (Австрия) в экспериментах *in vitro*

| Условия эксперимента | Раствор фибриногена и аprotинина «Фибриностат» | Раствор фибриногена и аprotинина «Тис-сукол кит», Вахтер (Австрия) |
|---|--|--|
| Время образования сгустка, с | | |
| Раствор тромбина 500 МЕ/мл и кальция хлорида («Фибриностат») | $5,8 \pm 0,17$ Сгусток плотный | $5,6 \pm 0,21$ Сгусток плотный |
| Раствор тромбина 500 МЕ/мл и кальция хлорида «Тиссукол кит», Вахтер (Австрия) | $5,2 \pm 0,23$ Сгусток плотный | $4,8 \pm 0,16$ Сгусток плотный |

2. Влияние на клеточный состав крови в опытах *in vivo*

При оценке результатов цитологического исследования «красной» крови установлено, что на 1-е сутки в контрольной группе отмечалось снижение уровня гемоглобина на 18,4%, гематокрита на 16,2%, а также снижение количества эритроцитов на 16,9% по сравнению с интактным контролем. Однако уже к 7-им суткам отмечалась тенденция к восстановлению исследуемых показателей. В группах сравнения и опытной значительных изменений в данных показателях не выявлено

Анализ параметров состояния «белой» крови у животных всех трех групп не показал значительных изменений количества и популяционного состава лейкоцитов периферической крови, которые сохранялись в пределах условной физиологической нормы на протяжении всего эксперимента.

Важное значение в сравнительной оценке эффективности применения «Фибриноста» имеет изучение первичного тромбоцитарного микроциркуляторного компонента гемостаза, в частности такого показателя как количество тромбоцитов. У животных интактного контроля количество тромбоцитов составляло $733 \pm 53,7 \cdot 10^9/\text{л}$. При моделировании травмы печени в контрольной и группе сравнения отмечалось снижение количества тромбоцитов на 1-е и 3-е сутки. В опытной группе с применением «Фибриноста» наоборот количество тромбоцитов на протяжении всего исследования было выше чем в интактной группе, однако данные показатели не выходили за пределы условной физиологической нормы (таблица 2).

Таблица 2. Динамика изменений клеточного состава крови

| Условия эксперимента | Исследуемый показатель | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------------|---|--|
| | Уровень гематокрита (%) | Концентрация гемоглобина (г/л) | Количество эритроцитов $10^{12}/\text{л}$ | Количество тромбоцитов $10^9/\text{л}$ |
| интактный контроль (n=5) | $37 \pm 1,1$ | $125 \pm 5,0$ | 6,1-8,6 | $733 \pm 53,7$ |
| Контрольная группа (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | $31 \pm 0,9$ | $102 \pm 3,8$ | $5,9 \pm 0,43$ | $665 \pm 190,5$ |
| 3-е сутки | $32 \pm 1,5$ | $106 \pm 5,2$ | $6,2 \pm 0,04$ | $689 \pm 346,9$ |
| 7-е сутки | $35 \pm 1,5$ | $110 \pm 5,3$ | $6,3 \pm 0,24$ | $932 \pm 62,5$ |
| Группа сравнения (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | $37 \pm 1,7$ | $117 \pm 12,1$ | $6,7 \pm 0,50$ | $609 \pm 93,2$ |
| 3-е сутки | $35 \pm 3,2$ | $111 \pm 8,9$ | $6,5 \pm 0,47$ | $581 \pm 60,8$ |
| 7-е сутки | $36 \pm 1,9$ | $127,8 \pm 10,8$ | $7,0 \pm 0,34$ | $668 \pm 110,6$ |
| Опытная группа (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | $37 \pm 0,8$ | $121 \pm 4,2$ | $6,6 \pm 0,25$ | $832 \pm 89,4$ |
| 3-е сутки | $38 \pm 0,8$ | $124 \pm 2,1$ | $6,8 \pm 0,26$ | $787 \pm 48,5$ |
| 7-е сутки | $37 \pm 1,5$ | $126 \pm 6,2$ | $7,2 \pm 0,42$ | $860 \pm 70,0$ |

$P < 0,05$

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что применение гемостатического средства «Фибриностат» предотвращало развитие анемии и тромбоцитопении у экспериментальных животных в раннем послеоперационном периоде.

2. Влияние на состояние свертывающей системы в опытах in vivo

При исследовании показателей коагуляционного гемостаза у животных контрольной группы зарегистрировано увеличение АЧТВ до $33,8 \pm 2,86$ с. и $39,6 \pm 0,1$ с. на первые и третьи сутки, и снижение содержания фибриногена до $1,5 \pm 0,42$ г/л на седьмые сутки посттравматического периода, что свидетельствует об угнетении механизмов внутреннего пути коагуляционного каскада и развивающейся коагулопатии потребления. Так же наблюдалось постепенное возрастание ТВ до

46,5±15,9 с. к седьмым суткам после травмы. Значение ПВ в контрольной группе оставалось в пределах физиологической нормы на протяжении всего наблюдения.

В отличие от группы контроля у животных с применением «Тиссукола» и «Фибриноста» значения АЧТВ, ТВ, и уровня содержания фибриногена в крови не изменялись на протяжении всего исследования. Наряду с этим в опытной группе к третьим суткам отмечалось уменьшение ПВ на 45 % по сравнению с интактным контролем, с последующей тенденцией к восстановлению до нормальных значений. Данный показатель составил на первые сутки 18,7±3,13 с., на третьи сутки 15,0±0,51 с. и на седьмые сутки - 16,8±1,82 с. Сходная динамика изменений ПВ отмечалась в группе сравнения, что свидетельствует об активации процесса протромбинообразования, поскольку этот тест характеризует функциональное состояние внешнего пути свертывания крови, а также активность факторов протромбинового комплекса (таблица 3).

Таблица 3. Динамика изменений коагулограммы

| Условия эксперимента | Исследуемый показатель | | | |
|--------------------------------|------------------------|-------------|-------------|------------------|
| | АЧТВ (с) | ПВ (с) | ТВ (с) | Фибриноген (г/л) |
| Условная физиологическая норма | 23,4 – 28,6 | 20,2 – 34,2 | 19,1 – 35,1 | 2,1 – 3,5 |
| интактный контроль (n=5) | 26,0±1,16 | 27,2±3,52 | 27,1±3,93 | 2,8±0,25 |
| Контрольная группа (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | 33,8±2,86 | 24,8±1,36 | 36,7±4,33 | 2,1±0,78 |
| 3-е сутки | 39,6±0,10 | 19,4±0,40 | 34,9±0,45 | 2,4±0,66 |
| 7-е сутки | 25,9±2,22 | 20,1±4,39 | 46,5±15,9 | 1,5±0,42 |
| Группа сравнения (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | 28,3±7,86 | 19,3±1,65 | 33,5±3,13 | 2,2±0,64 |
| 3-е сутки | 22,9±1,30 | 16,5±0,85 | 28,6±1,25 | 2,3±1,04 |
| 7-е сутки | 23,7±2,49 | 18,0±0,23 | 29,2±1,57 | 2,5±0,25 |
| Опытная группа (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | 25,4±1,89 | 18,7±3,13 | 32,7±1,25 | 2,7±0,41 |
| 3-е сутки | 26,7±2,75 | 15,0±0,51 | 27,7±2,57 | 3,1±0,29 |
| 7-е сутки | 29,9±2,40 | 16,8±1,82 | 30,2±1,92 | 2,7±0,24 |

P < 0,05

Сравнительная оценка гемостазиограмм контрольной, сравнительной и опытной групп позволила выявить гипокоагуляционную направленность изменений показателей гемостаза в целом у животных контрольной группы. В то же время в группах животных с применением «Фибриноста» и «Тиссукола» показатели второй фазы гемостаза практически находились в пределах условной физиологической нормы.

3. Влияние на белковый обмен, уровень трансаминаз и билирубина в опытах *in vivo*

Белковый обмен.

Использование в качестве кровоостанавливающего средства «Фибриноста» оказывало существенное влияние на регистрируемые параметры протеинового обмена в сравнении с контрольной группой крыс (таблица 4).

В контрольной группе животных уже спустя 24 часа после моделирования кровотечения происходило снижение содержания общего белка в плазме крови на 9,7% по сравнению с интактным контролем, и составило $65,33 \pm 1,713$. На момент завершения наблюдений, к седьмым суткам содержание общего белка у крыс этой серии продолжало оставаться на 13,9 % ниже исходных значений. В опытной и сравнительной группах крыс применение «Фибриноста» оказывало позитивное влияние на развитие постгеморрагической гипопроteinемии. Незначительное уменьшение содержания общего белка по сравнению с животными интактного контроля отмечалось только в группе с применением тиссукола на первые сутки. В остальные сроки наблюдения данный показатель был в пределах физиологической нормы.

Данные, по изучению содержания мочевины свидетельствуют о том, что в контрольной группе животных на первые сутки после травмы происходило увеличение содержания мочевины в плазме крови на 19,1% по сравнению с интактным контролем. На момент завершения наблюдений, к седьмым суткам содержание ее увеличилось на 31,7 %. В опытной и сравнительной группах животных данный показатель повышался на первые и третьи сутки, с последующим восстановлением к седьмым суткам практически до уровня нормальных значений. Эти результаты могут свидетельствовать о положительном влиянии изучаемого препарата на экскреторно-выделительную функцию почек и, косвенно, на сохранность детоксикационной функции печени

Таблица 4. Динамика изменений белкового обмена

| Условия эксперимента | Группы экспериментальных животных | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | интактный контроль (n=5) | контрольная группа (n=15) | группа сравнения (n=15) | опытная группа (n=15) |
| Содержание общего белка (г/л) | | | | |
| 1-е сутки | $71,97 \pm 1,881$ | $65,33 \pm 1,713$ | $67,28 \pm 2,395$ | $75,97 \pm 1,881$ |
| 3-е сутки | | $68,57 \pm 0,897$ | $71,86 \pm 1,810$ | $74,51 \pm 2,249$ |
| 7-е сутки | | $62,88 \pm 1,003$ | $69,24 \pm 1,409$ | $69,94 \pm 2,230$ |
| Содержание альбумина (г/л) | | | | |
| 1-е сутки | $36,41 \pm 0,537$ | $38,46 \pm 0,791$ | $41,01 \pm 0,747$ | $37,33 \pm 0,978$ |
| 3-е сутки | | $37,13 \pm 0,380$ | $38,18 \pm 0,799$ | $37,63 \pm 0,472$ |
| 7-е сутки | | $34,99 \pm 0,782$ | $38,15 \pm 1,458$ | $34,94 \pm 1,010$ |
| Содержание мочевины (ммоль/л) | | | | |
| 1-е сутки | $3,52 \pm 0,234$ | $4,35 \pm 0,732$ | $5,59 \pm 0,836$ | $4,58 \pm 0,099$ |
| 3-е сутки | | $5,83 \pm 0,635$ | $3,57 \pm 0,190$ | $5,45 \pm 0,371$ |

| | | | | |
|--------------|--|------------|------------|------------|
| 7-е сутки | | 5,15±0,501 | 3,68±0,488 | 3,81±0,228 |
|--------------|--|------------|------------|------------|

P < 0,05

Активность аминотрансфераз и уровень билирубина

Протеолитические ферменты (АЛТ и АСТ) рассматриваются как патогенетические маркеры синдрома цитолиза, повышение которых в крови связано с нарушением проницаемости мембран гепатоцитов или их гибелью и как следствие этого с тяжестью и распространенностью поражения печени.

В контрольной группе животных наблюдался рост уровня общего билирубина с первых по седьмые сутки, преимущественно за счет непрямой его фракции с одновременно возросшими в 2 раза цифрами АСТ и АЛТ на первые сутки. Следует отметить, что к седьмым суткам уровень АСТ в крови крыс нормализовался, что свидетельствует о умеренно выраженном нарушении функции печени (таблица 5.).

В группе сравнения, спустя 24 часа, так же отмечалось увеличение уровня билирубина и трансаминаз в 1,5-2 раза, одна-ко данные показатели уже на третьи сутки были сопоставимы с уровнем интактного контроля. В опытной группе отмечено увеличение уровня АЛТ на первые сутки, с нормализацией к седьмым суткам. Билирубин и АСТ не имели отклонений от физиологической нормы.

Таблица 5. Динамика изменений печеночных ферментов

| Условия эксперимента | Исследуемый показатель | | | |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|------------|
| | Общий билирубин (мкмоль/л) | Прямой билирубин (мкмоль/л) | АСТ (Ед/л) | АЛТ (Ед/л) |
| интактный контроль (n=5) | 12,05±0,776 | 1,65±0,100 | 109,2±9,24 | 37,1±4,85 |
| Контрольная группа (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | 11,03±0,623 | 6,82±2,645 | 239,0±60,18 | 81,7±6,64 |
| 3-е сутки | 14,00±0,941 | 3,05±0,689 | 80,3±29,95 | 66,0±7,37 |
| 7-е сутки | 15,31±1,286 | 1,88±0,565 | 96,5±13,58 | 80,81±1,80 |
| Группа сравнения (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | 16,46±2,404 | 2,66±0,619 | 188,3±23,21 | 45,8±6,22 |
| 3-е сутки | 11,92±0,523 | 2,46±0,648 | 98,5±13,62 | 36,3±4,48 |
| 7-е сутки | 12,53±0,804 | 3,10±0,463 | 150,3±36,81 | 28,6±5,07 |
| Опытная группа (n=15) | | | | |
| 1-е сутки | 8,60±2,054 | 2,23±0,254 | 117,6±11,57 | 71,2±9,72 |
| 3-е сутки | 4,19±0,458 | 2,98±0,338 | 103,7±12,38 | 61,4±9,79 |
| 7-е сутки | 6,46±0,795 | 2,31±0,238 | 95,4±4,42 | 45,8±4,48 |

P < 0,05

Полученные результаты свидетельствуют о том, что обеспечение гемостаза как «Фибриностагом», так и «Тиссуколом», в условиях экспериментальной травмы печени препятствует генерализации нарушений функций печени и способствует репарации поврежденной ткани в ранний послеоперационный период.

Выводы

1. Новое композиционное гемостатическое средство «Фибриностат» в экспериментах *in vitro* обладает выраженными сгусткообразующими свойствами, что идентично зарубежному препарату-аналогу «Тиссуколу».

2. Применение «Фибриностата» в качестве местного гемостатика при кровотечении из печени в опытах *in vivo*:

- препятствует развитию у лабораторных животных постгеморрагической анемии и гипопротеинемии;
- оказывает нормализующее влияние на показатели плазменного и клеточного гемостаза;
- способствует сохранению нормального функционирования печеночной ткани в ранний послеоперационный период.

Литература

1. Чумаков, О. Е., Руденко, В. П., Стежка, С. Н. Особенности ведения предоперационного периода у больных с нарушением в системе гемостаза // Вестник морского врача. 2008. № 6. С. 175–176.

2. Балуда, В. П., Сушкевич, Г. Н., Павловский, Д. П., Солодовников, А. Н., Войткевич, Л. Н. Способ остановки кровотечений препаратами местного патогенетического действия // Экспериментальная хирургия и анестезиология. 1976. № 2. С. 57–59.

3. Tuthill, D.D., Bayer, V. et al. Assessment of Topical Hemostats in Renal Hemorrhage Model in Heparinized Rats // J.Surg. Res. 2001. Vol. 95. № 2. P. 126–132.

4. Шапошников, Ю. Г., Решетников, Е. А., Михопулос, Т. А. Повреждения живота. М.: Медицина, 1986. 256 с.

5. Козлов, И. З., Горшков, С. З., Волков, В. С. Повреждения живота. М.: Медицина, 1988. 224 с.

6. Одишелашвили, Г. Д. Гемостаз при повреждениях печени, селезенки, почек и поджелудочной железы (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1996. 34 с.

7. Гаин, Ю. М. Неотложная хирургия органов брюшной полости. Минск, 2004. 298 с.

8. Брюсов, П. Г., Нечаев, Э. А. Военно-полевая хирургия / под ред. П. Г. Брюсова, Э. А. Нечаева. М.: ГЭОТАР, 1996. 416 с.

9. Долгов, В. В., Свирин, П. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Тверь, 2005. 227 с.

10. Kram, H.V., Nathan, R.C., Stafford, F.J. et al. Fibrin glue adhesives hemostasis in patients with coagulation disorders // Arch. Surg. 1989. Vol. 124. № 3. P. 385–387.

11. Иванов, Е. П. Диагностика нарушений гемостаза. Минск: «Беларусь», 1983. С. 113.

12. Адамян, А. А., Кашперский, Ю. П., Добыш, С. В. Местные гемостатические препараты из природных компонентов свертывающей системы: (Сообщ. 1) // Хирургия. 1993. № 11. С. 81–85.

13. Бордаков, В. Н., Доронин, М. В., Руденок, В. В., Клецкий, С. К. Оценка эффективности гемостатического средства местного действия «Фибриностат» при кровотечении из печени в эксперименте // Военная медицина. 2007. № 4. С. 98–101