

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040347**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.23

(21) Номер заявки
201900454

(22) Дата подачи заявки
2019.09.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/48** (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
A61J 1/00 (2006.01)
A61L 15/16 (2006.01)

(54) **ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛОКАЛЬНЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ IN VITRO**

(31) **2019109698**

(32) **2019.04.02**

(33) **RU**

(43) **2020.10.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ "НИИЦ ГЕМАТОЛОГИИ"
МИНЗДРАВА РОССИИ) (RU)**

**Момот Андрей Павлович, Белозеров
Дмитрий Евгеньевич, Пыхтеева
Марина Владимировна, Неведрова
Ольга Евгеньевна, Джулакян
Унан Левонович, Малыхина
Лариса Сергеевна, Бычичко
Дмитрий Юрьевич, Лемперт Асаф
Рудольфович, Мионов Максим
Сергеевич, Логвинова Юлия
Сергеевна (RU)**

(74) Представитель:
**Паровичникова Е.Н., Бахтияров М.Н.,
Лозова М.В. (RU)**

(56) **RU-C1-2373532
US-A1-20110204084
US-A-4153512**

(72) Изобретатель:
**Белозерская Галина Геннадьевна,
Кабак Валерий Алексеевич,
Голубев Евгений Михайлович,
Широкова Татьяна Ивановна,**

Липатов В.А. и др.: К вопросу о методологии сравнительного изучения степени гемостатической активности аппликационных кровоостанавливающих средств. *Новости хирургии*, 2018, т. 26, с. 81-95

(57) Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к тест-системам для проведения лабораторных исследований гемостатических свойств локальных раневых покрытий in vitro. Создана тест-система для проведения исследований гемостатических свойств локальных раневых покрытий in vitro, содержащая исследуемый материал, при этом в качестве исследуемого материала она содержит губку, адгезивно связанную с микропробиркой объемом от 0,1 до 15,0 мл, полученную из растворов, гелей, суспензий или других жидких лекарственных форм непосредственно в микропробирке путем замораживания исследуемого материала при атмосферном давлении 1 бар, при температуре +2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре -50,0°C в течение 255 мин, последующей сублимационной сушки при давлении 90 мкбар и температуре -50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре -20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре +5,0°C в течение 780 мин, с досушиванием полученных губок при давлении 90 мкбар, при температуре +35,0°C в течение 660 мин, обеспечивающая губке стандартный объем, вес, пористость и контактную поверхность, идентичную губкам большого размера, применяемым в экспериментах in vivo. Технический результат заключается в создании тест-системы, обеспечивающей проведение лабораторных исследований гемостатических свойств раневых покрытий в форме губки in vitro с большим объемом достоверной информации о показателях гемостаза и гемостатической активности исследуемых образцов стандартного объема, веса и пористости, полученных одновременно за счет исключения структурных повреждений губки и активных компонентов.

B1**040347****040347****B1**

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к тест-системам для проведения лабораторных исследований гемостатических свойств локальных раневых покрытий *in vitro*, дополняющих результаты экспериментов *in vivo*.

В настоящее время в уровне техники не представлены тест-системы для проведения лабораторных исследований гемостатических свойств локальных раневых покрытий *in vitro*, состоящие из микропробирки и адгезивно связанных с ней исследуемых образцов покрытий в форме губки. Такие системы, как правило, изготавливаются на месте в лабораториях путём помещения навески исследуемого покрытия в форме губки, содержащего основу или основу и активные вещества, в микропробирку на клеевую основу. Однако при приготовлении навесок невозможно стандартизировать образцы, повреждается структура губки и в микропробирке присутствует постороннее клеевое вещество, что приводит к увеличению погрешности при проведении исследований.

Известна тест-система для оценки функционального состояния гемостаза, содержащая термостатированную ячейку, в которую погружают пластинчатые электроды, соединенные с частотным генератором и блоком регистрации, и измеряют электропроводность помещенной в ячейку пробы крови при пропускании через нее переменного тока с частотой 200 Гц, по полученному изображению функциональной кривой электрокоагулограммы определяют следующие показатели:

t_1 - время, прошедшее от поступления порции крови в кювету до изменения амплитуды функциональной кривой в сторону ее уменьшения на 20 относительных единиц проводимости,

t_2 - время снижения амплитуды функциональной кривой на 100 ед.,

T - время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка и

$K=(t_2-t_1)/100$ - интенсивность тромбообразования, сравнивают их значения с нормой, которая составляет $t_1=8-14$ мин, $t_2=22-28$ мин, $T=54-65$ мин, при снижении величины показателей относительно нормы определяют состояние гиперкоагуляции, при повышении величины показателей относительно нормы определяют состояние гипокоагуляции.

Данный способ обеспечивает исследования лишь тромбообразования и является недостаточно "чувствительным" вследствие того, что не все стороны гемостатического процесса исследуемого гемостаза возможно проанализировать за счет данной тест-системы.

Наиболее близким аналогом является тест-система для оценки гемостатических свойств хирургических материалов, содержащая кювету с фиксированной фибриновым клеем к ее дну коллагеновой губки, применяемой для аппликационного гемостаза, объемом 2 мм³. При этом для исследования используют метод электрокоагулографии нативной донорской крови. Анализ полученных данных проводится на основе сравнительной оценки процента укорочения времени конца свертывания крови (%ук T_2) по отношению к контрольному опыту (электрокоагулография нативной донорской крови в кювете без материалов). Статистически достоверно большая величина %ук T_2 при сравнительном исследовании аппликационных средств гемостаза свидетельствует о более выраженных гемостатических свойствах. Изобретение обеспечивает точность оценки (RU 2373532, 20.11.2009). К недостаткам данной тест-системы относится то, что при ее использовании не решена проблема повреждения структуры исследуемой губки и ее недостаточная стандартизация для процесса исследования, отчего страдает достоверность и точность проводимых исследований. Интенсивное механическое воздействие со стороны измерительной ячейки электрокоагулографа на форменные элементы крови приводит к их деструкции, тем самым способствует выходу веществ, участвующих в процессе свертывания крови. Вместе с тем, за счет механического воздействия, вследствие разрушения нитей фибрина, нарушается формирование фибриновой сети, что значительно снижает чувствительность, воспроизводимость и точность электрокоагулографии, делает невозможным выявление тонких сдвигов в сложной системе [Липатов В.А. К вопросу о методологии сравнительного изучения степени гемостатической активности аппликационных кровоостанавливающих средств/В.А. Липатов, С.В. Лазаренко, К.А. Сотников, Д.А. Северинов, М.П. Ершов//Новости хирургии – 2018, - т. 26 - № 1-81-95 с].

Технический результат заключается в создании тест-системы, обеспечивающей проведение лабораторных исследований гемостатических свойств раневых покрытий в форме губки *in vitro* с большим объемом достоверной информации о показателях гемостаза и гемостатической активности исследуемых образцов стандартного объема, веса и пористости, полученных одновременно, за счет исключения структурных повреждений губки и активных компонентов.

Технический результат достигается тем, что создана тест-система для проведения лабораторных исследований гемостатических свойств раневых покрытий в форме губки *in vitro*, содержащая исследуемый материал, при этом в качестве исследуемого материала она содержит губку, адгезивно связанную с микропробиркой, объемом от 0,1 до 15,0 мл, полученную непосредственно в микропробирке путем замораживания исследуемого материала при атмосферном давлении 1 бар, при температуре +2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре -50,0°C в течение 255 мин, с последующей сублимационной сушкой при давлении 90 мкбар и температуре -50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре -20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре +5,0°C в течение 780 мин, с последующим досушиванием полученных губок при давлении 90 мкбар при температуре +35,0°C в течение 660 мин, обеспечивающей исследуемой губке стандартный объем, вес, пористость и контактную поверхность идентичную губкам, применяемым

в экспериментах *in vivo*.

В предпочтительном варианте исследуемая губка включает как минимум один гемостатически активный компонент.

В предпочтительном варианте исследуемая губка получена из раствора.

В предпочтительном варианте исследуемая губка получена из геля.

В предпочтительном варианте исследуемая губка получена из суспензии.

Тест-система создана следующим образом.

Для создания тест-системы используют губки, которые получают на основе природных или искусственных полимерных или белковых соединений, например солей альгиновой кислоты или хитозана, или каррагинана, или целлюлозы, и других полимеров, из которых готовят растворы, гели, суспензии и другие жидкие лекарственные формы и помещают их в микропробирки для лиофильной сушки. Состав губок может включать в качестве активных веществ белки крови, соли и соединения на основе металлов, растительные экстракты, минеральные вещества, ингибиторы фибринолиза, факторы свёртывания крови и другие. Значение pH итоговой смеси компонентов может варьироваться от 0,5 до 13,5.

Для создания тест-системы также предусмотрено использование микропробирок, применяемых в современной лабораторной практике, изготовленных из стекла, кварцевого стекла, полистирола или полипропилена, или других синтетических полимеров, применяемых в медицине, с коническим, круглым или плоским дном, градуированных или неградуированных, с защёлкивающейся или винтовой крышкой, или пробкой, бесцветных или окрашенных, стерильных или нестерильных, объёмом от 0,1 до 15,0 мл, в том числе и пробирок типа "эппендорф".

Заполненные с помощью пипеток-дозаторов одинаковыми объёмами растворов или гелей, или суспензий, или других жидких лекарственных форм микропробирки помещают в лиофилизатор и подвергают оптимальному режиму заморозки с последующей вакуумной сушкой и досушиванием. В результате в микропробирках получают одинаковые по объёму, массе и пористости губки, с контактной поверхностью, идентичной губкам, применяемым в экспериментах *in vivo*, используемые в дальнейшем для проведения тестов *in vitro* в условиях высокой достоверности показателей гемостаза без побочных эффектов.

Важнейшими параметрами при лиофильной сушке являются давление и температура. Процесс создания тест-системы проводят в три этапа: замораживание, первичная сушка и вторичная сушка. Каждый этап предъявляет конкретные требования к давлению и температуре. Первоначально продукт замораживают при температуре, достаточно низкой для того, чтобы обеспечить полную заморозку. На первичной стадии сушки должны быть созданы условия, благоприятные для лиофилизации. В то же время важным является сохранение характеристик продукта, поэтому необходимо, чтобы температура оставалась ниже определенного значения, которое называют критической температурой, составляющей -45°C . При температуре выше этого значения структура продукта разрушается, что приводит к усадке и растрескиванию. В идеале лиофильная сушка проводится при температурах чуть ниже критической -50°C . Давление в сушильной камере понижают, чтобы активировать процесс сушки.

Лиофилизация вызывает образование водяного пара в сушильной камере. Если пар не удалять из системы, он насыщается и частицы льда перестают сублимироваться. Частицы пара удаляются посредством ледового конденсора. Главная задача ледового конденсора - собирать водяной пар и другие конденсируемые газы. Молекулы воды естественным образом перемещаются к ледовому конденсору, чему способствует разница значений давления пара.

Раствор, или гель, или суспензию, или другие жидкие лекарственные формы, изготовленные на основе природных или синтетических полимеров с добавлением или без добавления активных веществ, объёмом от 0,1 до 15,0 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки. В частности, требуемое для экспериментов количество микропробирок помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при атмосферном давлении 1 бар, при температуре $+2,0^{\circ}\text{C}$ в течение 330 мин, затем при температуре $-50,0^{\circ}\text{C}$ в течение 255 мин. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мкбар при температуре $-50,0^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин, затем при температуре $-20,0^{\circ}\text{C}$ в течение 1850 мин, затем при температуре $+5,0^{\circ}\text{C}$ в течение 780 мин. После окончания режима лиофилизации производят досушивание полученных губок при давлении 90 мкбар при температуре $+35,0^{\circ}\text{C}$ в течение 660 мин. В результате получают тест-системы, содержащие одинаковые по объёму, весу и пористости образцы раневых покрытий в форме губки, с контактной поверхностью, идентичной губкам, применяемым в экспериментах *in vivo*, используемые в дальнейшем для проведения сравнительных методов исследования гемостатических свойств образцов раневых покрытий *in vitro*.

Представленные ниже примеры не являются ограничением объема прав в отношении тест-системы, поскольку она может содержать для проведения коагулологических исследований гемостатические губки, полученные также и из других природных (различные виды целлюлозы, крахмал, шёлк, кератин и др.) и синтетических (полиакрилаты, поливинилалкоголь, поливинилпирролидон, полиуретан и др.) полимеров.

Пример 1.

Для получения тест-системы 0,1-2,0% раствор альгината натрия в дистиллированной воде объёмом 0,1 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки объёмом 0,2 мл. Требуемое для исслед-

дований количество микропробирок с 0,1-2,0% раствором альгината натрия в дистиллированной воде объемом 0,1 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при атмосферном давлении 1 бар при температуре +2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре -50,0°C в течение 255 мин. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мкбар при температуре -50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре -20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре +5,0°C в течение 780 мин. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мкбар, при температуре +35,0°C в течение 660 мин. В результате получены тест-системы, содержащие гемостатическую губку, адгезивно связанную с микропробиркой и одинаковые по объему (0,08-0,1 мл), весу (0,04-0,06 г) и пористости (50-100), с контактной поверхностью, идентичной губке, применяемой в экспериментах *in vivo*, и используемые в дальнейшем для проведения сравнительных методов исследования гемостатических свойств образцов раневых покрытий *in vitro*.

Пример 2.

Для получения тест-системы 0,5-2,0% геля каппа-каррагинана в дистиллированной воде (ДВ) объемом 2,0 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки объемом 2,0 мл. Требуемое для исследований количество микропробирок с 0,5-2,0% гелем каппа-каррагинана в дистиллированной воде объемом 2,0 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при давлении 1 бар, при температуре +2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре -50,0°C в течение 255 мин. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мкбар при температуре -50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре -20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре +5,0°C в течение 780 мин. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мкбар, при температуре +35,0°C в течение 660 мин. В результате получены тест-системы, содержащие гемостатическую губку, адгезивно связанную с микропробиркой и одинаковые по объему (1,8-2,0 мл), весу (0,8-1 г) и пористости (50-100), с контактной поверхностью, идентичной губке, применяемой в экспериментах *in vivo*, и используемые в дальнейшем для проведения сравнительных методов исследования гемостатических свойств образцов раневых покрытий *in vitro*.

Пример 3.

Для получения тест-системы 0,5-2,0% раствор хитозана в 0,5% уксусной кислоте объемом 0,2 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки объемом 0,2 мл. Требуемое для исследований количество микропробирок с 0,5-2,0% раствором хитозана в 0,5% уксусной кислоте объемом 0,2 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при давлении 1 бар, при температуре +2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре -50,0°C в течение 255 мин. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мкбар при температуре -50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре -20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре +5,0°C в течение 780 мин. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мкбар, при температуре +35,0°C в течение 660 мин. В результате получены тест-системы, содержащие гемостатическую губку, адгезивно связанную с микропробиркой, одинаковые по объему (0,18-0,2 мл), весу (0,08-0,1 г) и пористости (50-100), с контактной поверхностью, идентичной губке, применяемой в экспериментах *in vivo*, и используемые в дальнейшем для проведения сравнительных методов исследования гемостатических свойств образцов раневых покрытий *in vitro*.

Пример 4.

Для получения тест-системы суспензию порошка крапивы в 2,0% растворе альгината натрия в дистиллированной воде объемом 5,0 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки объемом 5,0 мл. Требуемое для исследований количество микропробирок с суспензией порошка крапивы в 2,0% растворе альгината натрия объемом 5,0 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при давлении 1 бар, при температуре +2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре -50,0°C в течение 255 мин. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мкбар при температуре -50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре -20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре +5,0°C в течение 780 мин.

После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мкбар, при температуре +35,0°C в течение 660 мин. В результате получены тест-системы, содержащие гемостатическую губку, адгезивно связанную с микропробиркой, и одинаковые по объему (4,8-5,0 мл), весу (2,1-2,5 г) и пористости (50-100), с контактной поверхностью, идентичной губке, применяемой в экспериментах *in vivo*, и используемые в дальнейшем для проведения сравнительных методов исследования гемостатических свойств образцов раневых покрытий *in vitro*.

Гемостатические исследования проводили *in vivo* на экспериментальных животных, в частности, на кроликах породы Шиншилла, которые являются стандартными объектами для доклинических испытаний и рекомендуются для данных экспериментов в нормативном документе "Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств" Часть первая. -М.: Гриф и К, 2012, с. 453-479.

Животные приобретались в филиале "Электрогорский" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Приём животных в биоклинику производили при наличии ветеринарного свидетельства.

Подбор животных в группы осуществляли произвольно методом "случайных чисел", используя в

качестве критерия массу тела, которая составляла 3000-5000 г. Данные острые эксперименты на кроликах проводили под тиопенталовым наркозом. Время остановки кровотечения определяли по секундомеру. Критерием оценки момента остановки кровотечения являлось полное отсутствие проникновения крови через поверхность фиксированной на ране губки 25 мм в диаметре, применяемой *in vivo*. В течение эксперимента животные находились под глубоким наркозом и ощущения боли не испытывали. Животных выводили из эксперимента медленным внутривенным введением высокой дозы указанного наркотического средства.

Основным критерием эффективности образцов в форме губки в экспериментах *in vivo* была принята гемостатическая активность (ГА) как среднее арифметическое двух показателей: ГА по времени остановки кровотечения (ВОК) и ГА по объёму кровопотери. Гемостатическая активность по объёму кровопотери и по ВОК для марлевого тампона (контроль) составляла 0%. Гемостатическую активность по ВОК (GA_t , %) определяли по формуле 1

$$GA_t = \left(1 - \frac{t_2}{t_1}\right) \times 100 \% \quad (1),$$

где t_2 - ВОК при наложении образца, с;

t_1 - ВОК при наложении контроля, с.

Гемостатическую активность по объёму кровопотери (GA_v , %) определяли по формуле 2

$$GA_v = \left(1 - \frac{V_2}{V_1}\right) \times 100 \% \quad (2),$$

где V_2 - объём кровопотери при наложении образца, мл;

V_1 - объём кровопотери при наложении контроля, мл.

Гемостатическую активность (ГА, %) определяли как среднее арифметическое значение между гемостатической активностью по ВОК и по объёму кровопотери (формула 3)

$$GA = \frac{GA_t + GA_v}{2} \quad (3).$$

ГА определяли для каждой опытной точки. За окончательный результат испытаний принимали среднее арифметическое результатов пяти испытаний каждого из образцов.

Методы сравнительных коагулологических исследований *in vitro* гемостатических губок, применяемых *in vivo*, и аналогичных губок, полученных по примерам 1, 2, 3, 4.

1. Подсчет количества тромбоцитов в крови проводили с помощью гематологического анализатора МЕК-7222 J/K ("Ninon Kohden");

2. Оценка концентрации фибриногена в плазме крови по Clauss проводилась с помощью набора реагентов "Тех-Фибриноген-тест" (фирма "Технология-Стандарт") на автоматическом коагулометре "Systemex SA-1500" (фирма "Sysmex Corporation");

3. Интегральная оценка системы гемостаза изучалась по данным калиброванной тромбграфии [Hemker H., Giesen P., Al Dieri R. et al., Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma.//Pathophysiol. Haemost. Thromb. - 2003, - vol. 33, № 1, - P. 4-15.] (синоним - тест генерации тромбина (ТГТ)). Для выполнения ТГТ использовался планшетный флуориметр Fluoroskan Ascent (фирма "ThermoFisher SCIENTIFIC"), оснащенный диспенсером, с программным обеспечением "Thrombinoscope 3.0.0.26". Коагуляция исследуемой плазмы крови осуществлялась в присутствии 5 пмоль тканевого фактора и 4 мкмоль фосфолипидов (набор реагентов PPP-Reagent 5 pM, Thrombin Calibrator, FluCa-Kit). Генерация тромбина в бедной тромбоцитами плазме крови регистрировалась посредством измерения сигнала флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-АМС) (здесь и далее по тексту):

Lagtime - (время запаздывания, мин) - характеризует начало образования тромбина, достаточного для образования первых нитей фибрина;

ETP - эндогенный тромбиновый потенциал - площадь кривой генерации тромбина, учитывающей особенности инактивации этого фермента;

Peak thrombin - пиковая концентрация тромбина, нмоль/л - максимальная концентрация тромбина в единицу времени;

ttPeak - время достижения пика тромбина в минутах;

4. Тромбоэластометрия (ТЭМ) проводилась с применением тромбоэластометра 4-канального Rotem Gamma, фирмы "фирма Tem Innovations GmbH" и реагента "star-TEM" в режиме "Natem", (фирма "Pentapharm GmbH").

Определяемые в эксперименте параметры (здесь и далее по тексту):

СТ, с - активация факторов свертывания крови (время в с до амплитуды 2 мм)

Угол-альфа, градус - скорость образования сгустков фибрина

МСФ, мм - максимальная плотность сгустка (максимальная амплитуда)

СFT, с - время превращения фибриногена в фибрин (время в с от амплитуды в 2 мм до амплитуды в 20 мм)

A10, мм - плотность сгустка через 10 мин (амплитуда через 10 мин)

Пример 5.

Проведен сравнительный анализ гемостатических свойств губки, фиксированной на ране *in vivo* и полученной по примеру 1 тест-системы на основе 0,5-2,0% раствора альгината натрия в дистиллированной воде объемом 0,1 мл. Результаты приведены в табл. 1а, б.

Таблица 1а

	ГА*, % <i>In vivo</i>	Основные субстраты свертывания крови <i>In vitro</i>		Тромбоэластометрия <i>In vitro</i>				
		Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Фибриноген, г/л	СТ, с	Угол-альфа, градус	MCF, мм	CFT, с	A10, мм
Контроль 1 - марлевый тампон	0,00 $\pm 5,00$	182,00 $\pm 28,09$	3,39 $\pm 0,20$	583,00 $\pm 75,45$	47,00 $\pm 5,10$	50,00 $\pm 1,85$	287,00 $\pm 37,32$	40,00 $\pm 3,66$
Губка на основе альгината натрия 0,5 % в ДВ**	19,41 $\pm 3,51$	189,00 $\pm 30,69$	3,30 $\pm 0,47$	337,00 $\pm 11,09$	55,00 $\pm 3,39$	50,50 $\pm 1,67$	209,50 $\pm 8,80$	37,50 $\pm 1,67$
Губка на основе альгината натрия 2,0 % в ДВ**	57,34 $\pm 0,53$	52,50 $\pm 42,20$	3,47 $\pm 0,35$	353,00 $\pm 126,88$	34,00 $\pm 9,70$	44,50 $\pm 3,46$	454,50 $\pm 183,63$	25,50 $\pm 7,62$

ТА - гемостатическая активность

**ДВ - дистиллированная вода

Таблица 1б

	ГА*, % <i>In vivo</i>	Тест генерации тромбина (калибровочная тромбография по НЕМКЕР) <i>In vitro</i>			
		Lagtime, мин	ETP, нмоль/мин	Peak Thrombin, нмоль/л	ttPeak, мин
Контроль 1- марлевый тампон	0,00 $\pm 5,00$	2,82 $\pm 0,38$	2186,19 $\pm 164,41$	345,10 $\pm 33,48$	5,96 $\pm 0,64$
Губка на основе альгината натрия 0,5 % в ДВ**	19,41 $\pm 3,51$	3,17 $\pm 0,16$	2491,17 $\pm 458,64$	378,56 $\pm 50,88$	6,83 $\pm 0,34$
Губка на основе альгината натрия 2,0 % в ДВ**	57,34 $\pm 0,53$	3,33 $\pm 0,43$	3059,48 $\pm 343,51$	370,74 $\pm 58,91$	7,00 $\pm 0,25$

ТА - гемостатическая активность

**ДВ - дистиллированная вода

Как видно из табл. 1а, б, полученная по примеру 1 тест-система на основе 0,5-2,0% раствора альги-

ната натрия в дистиллированной воде объемом 0,1 мл обеспечивает достоверную информацию, получаемую одновременно в отношении большого количества показателей гемостаза и гемостатической активности. В частности, в исследуемой крови обнаружено снижение количества тромбоцитов, СТ, уменьшение угла-альфа, увеличение ЕТР по отношению к контролю. То есть при коагулологических исследованиях заявленная тест-система, содержащая губку на основе 0,5-2,0% альгината натрия, непосредственно созданная в микропробирке путем сублимационной сушки, аналогичной по структуре губке, применяемой *in vivo*, позволяет избежать структурных повреждений губки и активных компонентов и показывает высокую достоверность гемостатической активности данной тест-системы. Такие данные невозможно получить при исследовании непосредственно гемостатической губки *in vivo*.

Пример 6.

Проведен сравнительный анализ гемостатических свойств аналогичной губки большого размера, используемой *in vivo* и полученной по примеру 2 тест-системы на основе 0,5-2,0% геля на основе каппа-карагинана объемом 2,0 мл. Результаты приведены в табл. 2а, б.

Таблица 2а

	ГА, % <i>In vivo</i>	Основные субстраты свертывания крови <i>In vitro</i>		Тромбоэластометрия <i>In vitro</i>				
		Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	Фибриноген, г/л	СТ, с	Угол-альфа, градус	MCF, мм	CFT, с	A10, мм
Контроль 2 - марлевый тампон	0,00 ±5,00	201,00 ±16,00	3,27 ±0,23	669,00 ±57,10	52,00 ±3,20	53,50 ±1,70	230,50 ±30,60	40,50 ±2,20
Губка на основе каппа-карагинана 0,5 % гель	10,67 ±39,63	174,00 ±37,50	3,04 ±0,18	268,50 ±109,80	69,00 ±3,70	62,50 ±3,50	106,00 ±23,40	54,00 ±4,00
Губка на основе каппа-карагинана 2,0 % гель	76,09 ±4,49	63,00 ±18,10	3,35 ±0,08	232,00 ±86,30	75,50 ±4,30	67,50 ±3,30	72,50 ±22,70	59,50 ±5,00

Таблица 2б

	ГА, % <i>In vivo</i>	Тест генерации тромбина (калибровочная тромбография по НЕМКЕР) <i>In vitro</i>			
		Lagtime, мин	ЕТР, нмоль/мин	Peak Thrombin, нмоль/л	ttPeak, мин
Контроль 2 - марлевый тампон	0,00 ±5,00	2,67 ±0,35	2124,50 ±189,80	363,00 ±44,80	5,83 ±0,57
Губка на основе каппа-карагинана 0,5 % гель	10,67 ±39,63	2,17 ±0,29	2306,30 ±186,80	436,20 ±70,30	4,67 ±0,58
Губка на основе каппа-карагинана 2,0 % гель	76,09 ±4,49	2,33 ±0,13	2244,80 ±180,80	431,80 ±22,50	5,00 ±0,13

Как видно из табл. 2а, б, полученная по примеру 2 тест-система на основе 0,5-2,0% геля каппа-карагинана в дистиллированной воде объемом 2,0 мл, обеспечивает достоверную информацию, получаемую одновременно в отношении большого количества показателей гемостаза и гемостатической активности. В частности, в исследуемой крови обнаружено уменьшение количества тромбоцитов, СТ, CFT по отношению к контролю. То есть при коагулологических исследованиях заявленная тест-система, со-

держащая губку на основе 0,5-2,0% геля каппа-каррагинана в дистиллированной воде объемом 2,0 мл, непосредственно созданная в микропробирке путем сублимационной сушки, аналогичной по структуре губке, применяемой *in vivo*, позволяет избежать структурных повреждений губки и активных компонентов и показывает высокую достоверность гемостатической активности данной тест-системы. Такие данные невозможно получить при исследовании непосредственно гемостатической губки *in vivo*.

Пример 7.

Проведен сравнительный анализ гемостатических свойств аналогичной губки большого размера, используемой *in vivo* и полученной по примеру 3 тест-системы на основе 0,5-2,0% раствора хитозана в 0,5% уксусной кислоте объемом 0,2 мл. Результаты приведены в табл. 3а, б.

Таблица 3а

	ГА, % <i>In vivo</i>	Основные субстраты свертывания крови <i>In vitro</i>		Тромбоэластометрия <i>In vitro</i>				
		Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	Фибриноген, г/л	СТ, с	Угол-альфа, градус	MCF, мм	CFT, с	A10, мм
Контроль 3-марлевый тампон	0,00 ±5,00	181,50 ±16,90	2,82 ±0,44	698,00 ±7,20	38,50 ±4,30	45,50 ±85,40	356,50 ±4,70	30,50 ±0,10
Губка на основе хитозана 0,5% в 0,5%	51,47 ±37,93	86,00 ±22,80	2,90 ±0,59	744,00 ±61,10	54,00 ±6,70	57,00 ±5,70	202,00 ±73,30	42,00 ±1,70
УК*								
Губка на основе хитозана 2,0% в 0,5% УК*	65,65 ±9,68	27,00 ±6,20	3,08 ±0,75	685,50 ±48,30	54,00 ±6,60	55,00 ±6,00	220,00 ±51,80	40,50 ±5,70

*УК - уксусная кислота

Таблица 3б

	ГА, % <i>In vivo</i>	Тест генерации тромбина (калибровочная тромбография по НЕМКЕР) <i>In vitro</i>			
		Lagtime, мин	ETP, нмоль/мин	Peak Thrombin, нмоль/л	tiPeak, мин
Контроль 3-марлевый тампон	0,00 ±5,00	4,25 ±0,10	1775,50 ±353,30	250,79 ±39,09	9,90 ±0,80
Губка на основе хитозана 0,5% в 0,5% УК*	51,47 ±37,93	4,17 ±0,22	1407,70 ±275,80	189,69 ±64,39	8,50 ±1,30
Губка на основе хитозана 2,0% в 0,5% УК*	65,65 ±9,68	4,42 ±0,35	1438,40 ±486,60	208,47 ±80,37	8,60 ±0,80

*УК - уксусная кислота

Как видно из табл. 3а, б, полученная по примеру 3 тест-система на основе 0,5-2,0% раствора хитозана в 0,5% уксусной кислоте объемом 0,2 мл, также позволяет получить одновременно большое количество показателей гемостаза и гемостатической активности. Исследование данного образца крови показало уменьшение количества тромбоцитов, увеличение угла-альфа, снижение CFT по отношению к контролю. Таким образом, данная тест-система, содержащая губку на основе 0,5% и 2,0% раствора хитозана в 0,5% уксусной кислоте, непосредственно созданная в микропробирке путем сублимационной сушки, аналогичной по структуре губке, применяемой *in vivo*, позволяет избежать структурных повреждений

губки и активных компонентов и показывает высокую достоверность гемостатической активности данной тест-системы. Такие данные невозможно получить при исследовании непосредственно гемостатической губки *in vivo*.

Пример 8.

Проведен сравнительный анализ гемостатических свойств аналогичной губки большого размера, используемой *in vivo* и полученной по примеру 4 тест-системы на основе суспензии порошка крапивы в 2,0 % растворе альгината натрия в дистиллированной воде объемом 5,0 мл. Результаты приведены в табл. 4а, б.

Таблица 4а

	ГА, % <i>In vivo</i>	Основные субстраты свертывания крови <i>In vitro</i>		Тромбоэластометрия <i>In vitro</i>				
		Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Фибриноген, г/л	СТ, с	Угол-альфа, градус	MCF, мм	CFT, с	A10, мм
Контроль 4 – марлевый тампон	0,00 $\pm 5,00$	182,00 $\pm 28,09$	3,39 $\pm 0,20$	583,00 $\pm 75,45$	47,00 $\pm 5,10$	50,00 $\pm 1,85$	287,00 $\pm 37,32$	40,00 $\pm 3,66$
Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 % + лиофильно высушенного порошка крапивы (100 мг)	88,59 $\pm 2,14$	88,00 $\pm 23,90$	2,95 $\pm 0,64$	344,00 $\pm 55,10$	64,00 $\pm 6,70$	58,00 $\pm 5,80$	188,00 $\pm 73,30$	44,00 $\pm 1,90$
в ДВ								
Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 % + лиофильно высушенного порошка крапивы (200 мг) в ДВ	8,17 $\pm 14,33$	165,00 $\pm 6,20$	3,08 $\pm 0,75$	685,50 $\pm 48,30$	48,00 $\pm 5,60$	52,00 $\pm 5,00$	270,00 $\pm 50,70$	40,00 $\pm 4,30$

	ГА, % <i>In vivo</i>	Тест генерации тромбина (калибровочная тромбография по НЕМКЕР) <i>In vitro</i>			
		Lagtime, мин	ETP, нмоль/мин	Peak Thrombin, нмоль/л	ttPeak, мин
Контроль 4- марлевый тампон	0,00 ±5,00	2,82 ±0,38	2186,19 ±164,41	345,10 ±33,48	5,96 ±0,64
Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 % + лиофильно высушенного порошка крапивы (100 мг)	88,59 ±2,14	2,59 ±0,33	2568,59 ±172,11	370,53 ±35,10	6,59 ±0,77
в ДВ					
Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 % + лиофильно высушенного порошка крапивы (200 мг) в ДВ	8,17 ±14,33	2,99 ±0,53	2351,10 ±158,37	344,13 ±30,30	6,02 ±0,65

Как видно из табл. 4а,б, полученная по примеру 4 тест-система на основе суспензии порошка крапивы в 2,0% растворе альгината натрия в дистиллированной воде объемом 5,0 мл обеспечивает одновременное получение большого количества показателей гемостаза и гемостатической активности. Исследование данного образца крови показало уменьшение количества тромбоцитов, увеличение угла-альфа, снижение CFT по отношению к контролю. Таким образом, в результате коагулологических исследований заявленная тест-система, содержащая губку на основе суспензии из раствора альгината натрия 2,0 % + лиофильно высушенного порошка крапивы (100 и 200 мг) в дистиллированной воде, непосредственно созданная в микропробирке путем сублимационной сушки, аналогичной по структуре губке, применяемой *in vivo*, позволяет избежать структурных повреждений губки и активных компонентов и показывает высокую достоверность гемостатической активности данной тест-системы. Такие данные невозможно получить при исследовании непосредственно гемостатической губки *in vivo*, несмотря на ее большие размеры.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что такие тест-системы обладают высокой достоверностью, обеспечивают одновременное получение большого количества оцениваемых показателей гемостаза и гемостатической активности, протекающей на поверхности губок, и могут быть использованы для проведения коагулологических исследований образцов губок, полученных также и из других природных (различные виды целлюлозы, крахмал, шёлк, кератин и др.) и синтетических (полиакрилаты, поливинилалкоголь, поливинилпирролидон, полиуретан и др.) полимеров.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Тест-система для проведения исследований гемостатических свойств локальных раневых покрытий *in vitro*, содержащая исследуемый материал, отличающаяся тем, что в качестве исследуемого материала она содержит губку, изготовленную из различных лекарственных форм на основе природных полимеров, выбранных из альгината натрия, хитозана или каррагинана, помещенных в одинаковых объемах с помощью пипетки-дозатора в микропробирки, адгезивно связанную с микропробирками объемом от 0,1 до 15,0 мл, полученную непосредственно в микропробирках путем замораживания исследуемого материала при атмосферном давлении 1 бар, при температуре 2,0°C в течение 330 мин, затем при температуре минус 50,0°C в течение 255 мин, последующей сублимационной сушки при давлении 90 мкбар и

температуре минус 50,0°C в течение 60 мин, затем при температуре минус 20,0°C в течение 1850 мин, затем при температуре 5,0°C в течение 780 мин с досушиванием полученных губок при давлении 90 мкбар, при температуре 35,0°C в течение 660 мин, что обеспечивает губкам одинаковый объем в диапазоне от 0,08 до 5,00 мл, вес в диапазоне от 0,04 до 2,50 г, пористость в диапазоне от 50 до 100 и контактную поверхность, идентичную губкам, применяемым в экспериментах *in vivo*.

2. Тест-система по п.1, отличающаяся тем, что исследуемая губка включает как минимум один гемостатически активный компонент.

3. Тест-система по п.1, отличающаяся тем, что исследуемая губка получена из растворов, изготовленных на основе природных полимеров.

4. Тест-система по п.1, отличающаяся тем, что исследуемая губка получена из гелей, изготовленных на основе природных полимеров.

5. Тест-система по п.1, отличающаяся тем, что исследуемая губка получена из суспензий, изготовленных на основе природных полимеров.

