

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201900453** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.10.30**

(51) Int. Cl. **G01N 33/53 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.09.27**

---

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

---

(31) **2019109698**

(32) **2019.04.02**

(33) **RU**

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

(72) Изобретатель:

**Белозерская Галина Геннадьевна,  
Кабак Валерий Алексеевич,  
Голубев Евгений Михайлович,  
Широкова Татьяна Ивановна,  
Момот Андрей Павлович, Белозеров  
Дмитрий Евгеньевич, Пыхтеева  
Марина Владимировна, Неведрова  
Ольга Евгеньевна, Джулакян  
Унан Левонович, Малыхина  
Лариса Сергеевна, Бычичко  
Дмитрий Юрьевич, Лемперт Асаф  
Рудольфович, Миронов Максим  
Сергеевич (RU)**

---

(57) Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к оборудованию для проведения коагулологических, микробиологических и других лабораторных исследований in vitro. Описан тест на основе природного полимерного соединения для проведения лабораторных гемостатических исследований in vitro, включающий микропробирку и адгезивно связанную с ней исследуемую губку на основе природного полимерного соединения, полученную непосредственно в микропробирке путём сублимационной сушки. Технический результат: получен тест, применение которого позволяет уменьшить погрешность при проводимых экспериментах, исключить использование медицинского клея для закрепления пробы в микропробирке, а также упростит тестирование гемостатической активности in vitro в условиях производства кровоостанавливающих средств без проведения исследований на животных.

---

**A2**

**201900453**

**201900453**

**A2**

## ТЕСТ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ IN VITRO

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к оборудованию для проведения коагулологических, микробиологических и других лабораторных исследований *in vitro*.

В настоящее время в уровне техники не представлены тест-системы на основе помещённых в микропробирки гемостатических, лечебных и других губок, содержащих основу и активные вещества для проведения лабораторных коагулологических, микробиологических и других исследований *in vitro*. Такие системы, как правило, изготавливаются на месте в лабораториях путём помещения навески губки, содержащей основу или основу и активные вещества в микропробирку на клеевую основу. Однако, при этом происходит повреждение структуры губки, что приводит к увеличению погрешности при проведении исследований.

Известен способ лабораторного исследования, при котором на дно кюветы медицинским клеем фиксируется исследуемый хирургический материал (средства, применяемые в качестве гемостатических аппликационных имплантов, такие как губки на основе карбоксиметилцеллюлозы коллагена) объёмом 1 мм<sup>3</sup>. Обязательными условиями проведения сравнительного исследования являются стандартизация размеров исследуемых образцов, а также постановка контрольного опыта (в кювете коагулографа находится только необходимый объём нативной крови донора). Данный способ является недостаточно «чувствительным» вследствие того, что в процессе исследования имеет место интенсивное механическое воздействие со стороны измерительной ячейки электрокоагулографа на форменные элементы крови, что приводит к их деструкции, тем самым способствует выходу веществ, участвующих в процессе свёртывания 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 – 81–95с.].

Известна биомедицинская полисахаридная гемостатическая лечебная губка. Способ получения включает следующие стадии: во-первых, растворение полисахаридного материала карбоксиметилцеллюлозы, гиалуроновой кислоты или их смеси в щелочном растворе, достаточное перемешивание и набухание в коллоид; во-вторых, добавление сшивающего агента в коллоид, достаточное перемешивание, инкубацию в однородный гель и диализацию и очистку полученного геля; в-третьих, добавление глицерина в очищенный продукт и, наконец, проведение сублимационной сушки при низкой температуре для получения обезвоженной губки (патент CN 103480033).

Наиболее близким аналогом является патент РФ № 2618896, в котором описана гемостатическая губка, содержащая основу и активное вещество, высушенные сублимационной сушкой.

Недостатком известных решений относится то, что при их осуществлении не решена проблема повреждения структуры губки и нанесенного на неё активного вещества отчего страдает точность проводимых исследований.

Задачей, на решение которой направлена заявляемая полезная модель, является получение тест-системы для проведения лабораторных исследований *in vitro*, применение которой позволяет уменьшить погрешность при проводимых экспериментах.

Поставленная задача решается путём применения теста для проведения лабораторных исследований *in vitro*, который включает микропробирку и исследуемую губку. При этом исследуемая губка включает основу и при

необходимости гемостатически активные и/или лекарственные компоненты. Губка получена непосредственно в микропробирке путём сублимационной сушки из растворов, гелей или зелей, суспензий или дисперсных растворов, что позволяет избежать структурных повреждений губки и активных компонентов при их размещении в микропробирке. Так же в процессе сублимационной сушки происходит адгезивное сцепление поверхностей исследуемой губки и микропробирки, что фиксирует положение губки без использования медицинского клея.

Для получения губок одинакового объёма, массы и пористости, с контактной поверхностью, идентичной губкам большого размера, применяемым в экспериментах *in vivo*, помещённых в микропробирки, готовых к проведению различных лабораторных исследований *in vitro*, нами предложено приготовление растворов, зелей или гелей, дисперсных растворов или суспензий, или других жидких лекарственных форм с взятыми в качестве основы альгинатом натрия или хитозаном, или каррагинаном, или целлюлозой, или другими природными полимерными или белковыми соединениями. 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 рН итоговой смеси компонентов может варьироваться от 0,5 до 13,5. После приготовления одинаковые объёмы (от 0,1 до 15,0 мл) растворов, зелей или гелей, дисперсий или суспензий, с помощью микропипеток помещают в микропробирки.

Настоящим способом получения губок предусмотрено использование микропробирок, используемых 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 с

пробкой, бесцветных или окрашенных, стерильных или нестерильных, объемом от 0,1 до 15,0 мл, в том числе и пробирок типа «эппендорф».

Заполненные одинаковыми объемами водных 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 большого размера, применяемым в экспериментах *in vivo*, используемые в дальнейшем для проведения коагулологических, микробиологических и других лабораторных исследований *in vitro*.

Важнейшими параметрами при лиофильной сушке являются давление и температура. Стандартный процесс лиофильной сушки можно разделить на три этапа: замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Каждый этап предъявляет конкретные требования к давлению и температуре. Первоначально продукт замораживается 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. При температуре выше этого значения структура продукта разрушается, что приводит к усадке и растрескиванию. В идеале лиофильная сушка проводится при температурах чуть ниже критической. 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. Температура ледового конденсора должна быть значительно ниже температуры замороженного продукта – обычно на 15 °С.

Раствор, золь или гель, дисперсию или суспензию, или другие жидкие лекарственные формы на основе природных или синтетических полимеров с добавлением или без добавления активных веществ объемом 1,0 мл с помощью пипетки-дозатора помещался в микропробирки. Требуемое для экспериментов количество микропробирок помещалось в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производилось замораживание при атмосферном давлении при температуре +2,0°С в течении 330 мин, затем атмосферном давлении при температуре -50,0°С в течении 255 мин. После окончания режима замораживания производилась лиофилизация при давлении 90 мбар при температуре -50,0°С в течении 60 мин, затем при давлении 90 мбар при температуре -20,0°С в течении 1850 мин, затем при давлении 90 мбар при температуре +5,0°С в течении 780 мин. После окончания режима лиофилизации производилось досушивание полученных губок при давлении 90 мбар при температуре +35,0°С в течении 660 мин. В результате в микропробирках получали одинаковые по объему, весу и пористости губки, с контактной поверхностью, идентичной губкам большого размера, применяемым в экспериментах *in vivo*, используемые в дальнейшем для проведения коагулологических, микробиологических и других лабораторных методов исследования *in vitro*.

#### Пример 1.

0,1 - 3,0 % раствор альгината натрия в дистиллированной воде объемом 0,2 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки объемом 0,2 см<sup>3</sup>. Требуемое для исследований количество микропробирок с 0,1 - 3,0 % раствора альгината натрия в дистиллированной воде объемом 0,2 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при давлении 1 бар при температуре +2,0°С в течение 330 минут, затем при температуре -50,0°С в течение 255 минут. После окончания режима

замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар при температуре  $-50,0^{\circ}\text{C}$  в течение 1850 минут, затем при температуре  $+5,0^{\circ}\text{C}$  в течение 780 минут. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мбар при температуре  $+35,0^{\circ}\text{C}$  в течение 660 минут. В результате в микропробирках получены одинаковые по объему (0,2 мл), весу (0,1 г) и пористости (1,0) губки, применяемые в дальнейшем для проведения коагулологических, микробиологических и других лабораторных методов исследований.

#### Пример 2.

3,0 -10,0 % гель на основе альгината натрия объемом 0,2 мл с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки. Требуемое количество микропробирок с 3,0 -10,0% гелем на основе альгината натрия объемом 0,2 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при давлении 1 бар при температуре  $+2,0^{\circ}\text{C}$  в течение 330 минут, затем при температуре  $-50,0^{\circ}\text{C}$  в течение 255 минут. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар при температуре  $-50,0^{\circ}\text{C}$  в течение 1850 минут, затем при температуре  $+5,0^{\circ}\text{C}$  в течение 780 минут. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мбар при температуре  $+35,0^{\circ}\text{C}$  в течение 660 минут. В результате в микропробирках получены одинаковые по объему (0,2 мл), весу (0,1 г) и пористости (1,0) губки, используемые в дальнейшем для проведения коагулологических, микробиологических и других лабораторных методов исследования.

#### Пример 3.

В 3,0 % растворе каррагинана в дистиллированной воде растворяют гемостатические средства: эpsilon-аминокапроновую кислоту, минеральные вещества с гемостатическим действием, пластификаторы при температуре  $20^{\circ}\text{C}$  и постоянном перемешивании на шейкере в течение 60 мин до получения однородной массы. Затем 0,2 мл полученной однородной массы с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки. Требуемое для

исследования количество микропробирок с полученной однородной массой природных полимеров и активных веществ 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 минут, затем при температуре -50,0°C в течение 255 минут. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар при температуре -50,0°C в течение 1850 минут, затем при температуре +5,0°C в течение 780 минут. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мбар при температуре +35,0°C в течение 660 минут. В результате в микропробирках получены одинаковые по объему (0,2 мл), весу (0,1 г) и пористости (0) губки, используемые в дальнейшем для проведения сравнительных коагулологических, микробиологических и других лабораторных методов исследования.

#### Пример 4.

В 10,0% геле на основе целлюлозы растворяют антибиотики, антимикробные средства и металлические соли при температуре 75°C и постоянном перемешивании на шейкере в течение 60 мин до получения однородной массы. Затем 15 мл полученной однородной массы с помощью пипетки-дозатора помещают в микропробирки. Требуемое для исследования количество микропробирок с полученной однородной массой природных полимеров и активных веществ объемом 15 мл помещают в лиофилизатор CS 15-0.7. Затем производят замораживание при давлении 1 бар при температуре +2,0°C в течение 330 минут, затем при температуре -50,0°C в течение 255 минут. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар при температуре -50,0°C в течение 1850 минут, затем при температуре +5,0°C в течение 780 минут. После окончания режима лиофилизации проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мбар при температуре +35,0°C в течение 660 минут. В результате в микропробирках получены одинаковые по объему (15,0 мл), весу (14,0 г) и

пористости (1,0) губки, используемые в дальнейшем для проведения лабораторных методов исследования.

#### Пример 5.

Для получения тест-системы 0,5 - 2,0 % гель 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 минут, затем при температуре -50,0°C в течение 255 минут. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар 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 мбар, при температуре +35,0°C в течение 660 минут. 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 6.

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 минут, затем при температуре -50,0°C в течение 255 минут. После окончания

режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар 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 проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мбар, при температуре  $+35,0^{\circ}\text{C}$  в течение 660 минут. 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 7.

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  $+2,0^{\circ}\text{C}$  в течение 330 минут, затем при температуре  $-50,0^{\circ}\text{C}$  в течение 255 минут. После окончания режима замораживания производят лиофилизацию при давлении 90 мбар 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 проводят досушивание полученных губок при давлении 90 мбар, при температуре  $+35,0^{\circ}\text{C}$  в течение 660 минут. В результате получены тест-системы, содержащие гемостатическую губку, адгезивно связанную с микропробиркой и одинаковые по объему (4,8 – 5,0 мл), весу (2,1 - 2,5г) 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 иК, 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 (ГА<sub>At</sub>, %) определяли по формуле 1:

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

где  $t_2$  — ВОК при наложении образца, с;  $t_1$  — ВОК при наложении контроля, с.

Гемостатическую активность по объёму кровопотери ( $\Gamma A_v$ , %) определяли по формуле 2:

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

где  $V_2$  — объём кровопотери при наложении образца, мл;  $V_1$  — объём кровопотери при наложении контроля, мл.

Гемостатическую активность ( $\Gamma A$ , %) определяли как среднее арифметическое значение между гемостатической активностью по ВОК и по объёму кровопотери (Формула 3):

$$\Gamma A = \frac{\Gamma A_t + \Gamma A_v}{2} \quad (3).$$

$\Gamma A$  определяли для каждой опытной точки. За окончательный результат испытаний принимали среднее арифметическое результатов пяти испытаний каждого из образцов.

Подсчет количества тромбоцитов в крови проводили с помощью гематологического анализатора МЕК-7222 J/K («Nihon Kohden»).

Оценка концентрации фибриногена в плазме крови по Clauss проводилась с помощью набора реагентов «Тех-Фибриноген-тест» (фирма «Технология-Стандарт») на автоматическом коагулометре «Sysmex CA-1500» (фирма «Sysmex Corporation»).

Интегральная оценка системы гемостаза изучалась по данным калиброванной тромбографии [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 флюориметр 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-AMC) (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):

- **CT, с** – активация факторов свертывания крови (время в с до амплитуды 2 мм)
- **Угол-альфа, градус** - скорость образования сгустков фибрина
- **MSF, мм** – максимальная плотность сгустка (максимальная амплитуда)
- **SFT, 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 8.

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 таблице 1а,б.

Таблица 1а.

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

\*ГА – гемостатическая активность

\*\*ДВ – дистиллированная вода

Таблица 1б.

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

\*ГА – гемостатическая активность

\*\*ДВ – дистиллированная вода

Как видно из таблицы 1 а,б, полученная по примеру 1 тест-система на основе 0,5 - 2,0 % раствора альгината 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 ETP 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 9.

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

Таблица 2а.

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

Таблица 26.

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

Как видно из таблицы 2 а,б, полученная по примеру 5 тест-система на основе 0,5 – 2,0 % геля каппа-каррагинана 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, содержащая 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 10.

Проведен сравнительный анализ гемостатических свойств аналогичной губки большого размера, используемой *in vivo* и полученной по примеру 6 тест-системы на основе 0,5 - 2,0 % раствора хитозана в 0,5 % уксусной кислоте объемом 0,2 мл. Результаты приведены в таблице 3 а,б.

Таблица 3а.

|  | ГА, %<br><i>In vivo</i> | Основные субстраты свертывания крови<br><i>In vitro</i> |                    | Тромбоэластометрия<br><i>In vitro</i> |                     |                      |                       |                     |
|--|-------------------------|---|--------------------|---------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
|  |                         | Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$                      | Фибриноген, г/л    | СТ, с                                 | Угол-альфа, градус  | МСF, мм              | СFТ, с                | А10, мм             |
| Контроль 3-марлевый тампон                 | 0,00<br>$\pm 5,00$      | 181,50<br>$\pm 16,90$                                   | 2,82<br>$\pm 0,44$ | 698,00<br>$\pm 7,20$                  | 38,50<br>$\pm 4,30$ | 45,50<br>$\pm 85,40$ | 356,50<br>$\pm 4,70$  | 30,50<br>$\pm 0,10$ |
| Губка на основе хитозана 0,5 % в 0,5 % УК* | 51,47<br>$\pm 37,93$    | 86,00<br>$\pm 22,80$                                    | 2,90<br>$\pm 0,59$ | 744,00<br>$\pm 61,10$                 | 54,00<br>$\pm 6,70$ | 57,00<br>$\pm 5,70$  | 202,00<br>$\pm 73,30$ | 42,00<br>$\pm 1,70$ |
| Губка на основе хитозана 2,0 % в 0,5 % УК* | 65,65<br>$\pm 9,68$     | 27,00<br>$\pm 6,20$                                     | 3,08<br>$\pm 0,75$ | 685,50<br>$\pm 48,30$                 | 54,00<br>$\pm 6,60$ | 55,00<br>$\pm 6,00$  | 220,00<br>$\pm 51,80$ | 40,50<br>$\pm 5,70$ |

\*УК – уксусная кислота

Таблица 3б.

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

\*УК – уксусная кислота

Как видно из таблицы 3 а,б, полученная по примеру б 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 11.

Проведен сравнительный анализ гемостатических свойств аналогичной губки большого размера, используемой *in vivo* и полученной по примеру 7 тест-системы на основе суспензии порошка крапивы в 2,0 % растворе альгината натрия в дистиллированной воде объемом 5,0 мл. Результаты приведены в таблице 4 а, б.

Таблица 4а.

|   | ГА, %<br><i>In vivo</i> | Основные субстраты свертывания крови<br><i>In vitro</i> |                    | Тромбоэластометрия<br><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<br>$\pm 5,00$      | 182,00<br>$\pm 28,09$                                   | 3,39<br>$\pm 0,20$ | 583,00<br>$\pm 75,45$                 | 47,00<br>$\pm 5,10$ | 50,00<br>$\pm 1,85$ | 287,00<br>$\pm 37,32$ | 40,00<br>$\pm 3,66$ |
| Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 % + лиофильно высушенного порошка крапивы (100 мг) в ДВ | 88,59<br>$\pm 2,14$     | 88,00<br>$\pm 23,90$                                    | 2,95<br>$\pm 0,64$ | 344,00<br>$\pm 55,10$                 | 64,00<br>$\pm 6,70$ | 58,00<br>$\pm 5,80$ | 188,00<br>$\pm 73,30$ | 44,00<br>$\pm 1,90$ |

|   |                |                 |               |                  |                |                |                  |                |
|---|----------------|-----------------|---------------|------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|
| Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 %+лиофильно высушенного порошка крапивы (200 мг) в ДВ | 8,17<br>±14,33 | 165,00<br>±6,20 | 3,08<br>±0,75 | 685,50<br>±48,30 | 48,00<br>±5,60 | 52,00<br>±5,00 | 270,00<br>±50,70 | 40,00<br>±4,30 |
|---|----------------|-----------------|---------------|------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|

Таблица 46.

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

|   |                |               |                    |                  |               |
|---|----------------|---------------|--------------------|------------------|---------------|
| ДВ  |                |               |                    |                  |               |
| Губка на основе раствора альгината натрия 2,0 %+лиофильно высушенного порошка крапивы (200 мг) в ДВ | 8,17<br>±14,33 | 2,99<br>±0,53 | 2351,10<br>±158,37 | 344,13<br>±30,30 | 6,02<br>±0,65 |

Как видно из таблицы 4 а,б, полученная по примеру 7 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 ИЗОБРЕТЕНИЕ

1. Тест на основе природного полимерного соединения для проведения лабораторных гемостатических исследований *in vitro*, включающий микропробирку и адгезивно связанную с ней исследуемую губку на основе природного полимерного соединения, полученную непосредственно в микропробирке путём сублимационной сушки.
2. Тест по п. 1, отличающийся тем, что исследуемая губка включает основу покрытую как минимум одним гемостатически активным и/или лекарственным компонентами.
3. Тест по п. 1, отличающийся тем, что исследуемая губка получена из раствора, геля, золя, суспензии или дисперсного раствора.