

В. Н. Гапанович¹, Г. Н. Тризно², Ю. М. Гаин³, Е. Л. Бердина¹,
С. В. Андреев¹, Е. Н. Васильева¹, М. П. Лапковский¹

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО МЕСТНОГО ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ

РУП «Научно-практический центр ЛОТИОС»¹
УЗ «4-я клиническая больница им. Н. Е. Савченко»²
Военно-медицинский институт
в УО «Белорусский государственный медицинский университет»³

В ходе проведенных исследований острой токсичности при внутрибрюшинном введении аутбредным мышам обоего пола комплексного местного гемостатического средства (КМГС) на основе неорганических солей установлено, что LD_{50} для самцов составляет 227,8 мг/кг (205,1÷350,5), для самок – 262,5 мг/кг (195,8÷329,2).

Полученные данные по изучению острой токсичности на беспородных белых мышах позволяют отнести раствор для местного применения КМГС к IV классу токсичности (малотоксично) в соответствии с классами токсичности веществ (модифицированная классификация Организации экономического содействия и развития OECD).

Ключевые слова: комплексное местное гемостатическое средство (КМГС), острая токсичность, средняя летальная доза LD_{50} .

V. N. Gapanovich, G. N. Trizno, Yu. M. Gain, E. L. Berdina, S. V. Andreev,
E. N. Vasilyeva, M. P. Lapkovsky

PRECLINICAL SAFETY ASSESSMENT OF A NEW COMPLEX LOCAL HEMOSTATIC AGENT BASED ON INORGANIC SOLTS

During the conducted studies of acute toxicity with intraperitoneal administration of a complex local hemostatic agent (CLHA) based on inorganic salts to outbred mice of both sexes, it was established that LD_{50} for males is 227,8 mg/kg (205,1÷350,5), for females – 262,5 mg/kg (195,8329,2).

The obtained data on the study of acute toxicity on outbred white mice allow us to classify the solution for local application of CLHA to toxicity class IV (low toxic) in accordance with the toxicity classes of substances (modified classification of the Organization for Economic Cooperation and Development OECD).

Key words: complex local hemostatic agent (CLHA), acute toxicity, median lethal dose LD_{50} .

Одной из принципиально важных задач современной хирургии является обеспечение эффективного гемостаза. Подсчитано, что до 85 % времени при проведении различных оперативных вмеша-

тельств затрачивается на борьбу с кровотечением [1]. При этом эффективность гемостаза во время операции во многом зависит от состояния клеточного и плазменного звеньев свертывающей системы

крови пациента. Возможно влияние на эти механизмы гемостаза путём введения факторов свертывания и компонентов крови, ингибиторов фибринолиза, антагонистов гепарина, повышающих вязкость крови и других средств. Новые горизонты в достижении гемостаза открываются при использовании препаратов местного действия, целенаправленно и локально проявляющих свои кровеостанавливающие свойства, делая незаменимым их использование в остановке капиллярных, паренхиматозных и других диффузных кровотечений, в том числе в условиях нарушения свертываемости крови при различных заболеваниях и патологических состояниях, обусловленных изолированным или сочетанным расстройством сосудисто-тромбоцитарного и плазменного механизмов гемостаза [2, 3]. К настоящему времени белорусскими учеными разработана и использована в клинической практике целая линейка (серия) гемостатических средств местного действия на основе неорганических солей [4]. Сотрудниками республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр ЛОТИОС» разработано новое комплексное местное гемостатическое средство (КМГС) с основными действующими веществами в виде алюминия хлорида 6-водного и железа (III) хлорида 6-водного с включением ряда других ингредиентов. Ранее были изучены отдельные свойства данного соединения, касающиеся безопасности его применения в эксперименте при остановке кровотечения из печени, сопоставимые с действием коммерческого лекарственного средства «Вискостат» на основе сульфата железа («Ultradent», США) [5].

Цель исследования: изучить острую токсичность (с определением средней летальной дозы, LD50) нового комплексного местного гемостатического средства на основе неорганических солей при внутрибрюшинном однократном введении мелким лабораторным животным (аутбредным мышам обоего пола).

Материалы и методы

КМГС предназначено для оказания быстрого гемостатического эффекта при оперативных вмешательствах, в том числе – на паренхиматозных органах. Технология его получения разработана сотрудниками отдела экспериментальной медицины и фармации предприятия-разработчика. В составе 10 мл лекарственного препарата входят: а) алюминия хлористого 6-водного – 1000 мг, б) железа (III) хлорида 6-водного – 500 мг, в) поливинилового спирта – 800 мг, г) воды очищенной – до 10 мл. Внешне КМГС представляет собой густую вязкую прозрачную жидкость желто-оранжевого цвета без запаха, плотностью 1,05 г/см³, pH 1,25, вязкостью 210,7 мм²·с⁻¹. При этом количественно испытуемый препарат содержит 49,4 мг/мл железа (III) хлорида 6-водного и 94,0 мг/мл алюминия хлористого 6-водного, выдерживает качественные испытания на содержание железа-аниона, алюминия, хлоридов и поливинилового спирта, соответствуя всем требованиям нормативной документации.

Необходимый объем исследований, вид животных, а также общие методические подходы к изучению острой токсичности препарата были определены в соответствии с действующими нормативными правовыми техническими актами (ТНПА) – ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика» и другими обязательными регламентируемыми материалами [6–8].

В исследовании использовано 60 аутбредных мышей обоих полов возрастом 8–10 недель разведения «Питомник лабораторных животных» ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», которые содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [9] на основе

стандартных операционных процедур. Было сформировано по 4 экспериментальные серии самок и самцов по 6 особей в каждой, и две контрольных (самки, самцы; также по 6 особей). Группы животных формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака (разброс по исходной массе между и внутри групп в пределах одного пола не превышал $\pm 10\%$).

Раствор тестируемого вещества вводили однократно внутривентриально, точно перерасчитывая объем в зависимости от массы тела животного. Исследование проводили отдельно для самок и самцов. Лекарственное средство начинали вводить с дозы 375 мг/кг (0,05 мл/20 г), далее – уменьшение с шагом 75 мг/кг (0,01 мл/20 г). За животными наблюдали на протяжении 14 суток, ежедневно проводя мониторинг их общего состояния и отслеживая количество погибших по сериям/группам. Наблюдение за животными осуществляли в следующие временные промежутки: в день введения – через 5 и 30 минут, 1, 2, 4 и 6 часов, затем – на 1, 3, 7, 10 и 14 суток после введения раствора гемостатического средства. При этом регистрировали следующие параметры интоксикации: 1) агрессивность; 2) вокализация; 3) тремор; 4) судороги; 5) двигательная активность; 6) расстройство походки; 7) изменение саливации; 8) состояние волосяного покрова; 9) тонус сосудов уха; 10) изменение дыхания; 11) состояние ЖКТ.

Взвешивание осуществляли 3 раза в течение периода наблюдений. Массу тела животных определяли до, через 7 и 14 суток после введения тестируемого вещества с помощью весов Scout Pro («Mettler-Toledo», Китай) и высчитывали её относительный прирост (в %).

Проводили вскрытие животных, павших в течение рабочего дня (макроскопическое описание внутренних органов), а по окончании эксперимента – всех выживших (определение относительной массы орга-

нов, макроскопическое описание). В ходе некропии животных выделяли сердце, легкие (оба), печень, почки (обе), селезенку. Органы промывали в физиологическом растворе, просушивали на фильтровальной бумаге и взвешивали на весах Scout Pro («Mettler-Toledo», Китай), относя массу исследуемого органа к массе животного.

В результате исследования устанавливали среднюю летальную дозу (LD_{50}) – количество химического вещества, которое является смертельным для половины (50 %) подопытных животных, подвергшихся его воздействию. LD_{50} выражалась как вес введенного химического вещества на единицу веса тела животного (мг/кг).

При статистической обработке результатов исследования использовали пакет программ «Statistica 64 version 12» (2014) (StatSoft Inc., США). Проверку статистической гипотезы о виде распределения количественных признаков осуществляли на основании критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk).

Для данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$).

Достоверность различий между сравниваемыми величинами была определена с помощью параметрических (t -критерий Стьюдента) методов статистического анализа. Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$ и отмечали значком*.

Информация, полученная в ходе проведенного исследования, не дублирует результаты других проводимых ранее исследований.

Результаты и обсуждение

Клинические проявления токсического поражения лабораторных животных и смертность после однократного внутривентриального введения КМГС зависели от дозы препарата и половой принадлежности животных. При этом принято, что терапевтическая доза препарата с доста-

Таблица 1. Параметры острой внутрибрюшинной токсичности КМГС на мышах

Вид животных	Пол	Доза, мг/кг	Выживаемость, %	LD ₅₀ , мг/кг	LD ₁₆ , мг/кг	LD ₅₀ , мг/кг с доверительными границами (при $p < 0,05$)	LD ₈₄ , мг/кг
Мыши	Самцы	150	83,3	227,8±35,1	156,1	227,8 (205,1÷350,5)	399,6
		225	66,7				
		300	50,0				
		375	16,7				
	Самки	150	83,3	262,5±32,2	150,9	262,5 (195,8÷329,2)	374,1
		225	66,7				
		300	33,3				
		375	16,7				

точной гомеостатической активностью в отношении паренхиматозного (капиллярного) кровотечения составляет 75 мг/кг.

После внутрибрюшинного введения тестируемого вещества за животными осуществляли наблюдение в течение 2 недель: регистрировали выживаемость, проводили внешний осмотр, отмечали поведенческие реакции и другие общепринятые показатели общего состояния.

Интенсивность клинических проявлений интоксикации находилась в прямой зависимости от вводимой дозы КМГС, при этом симптомы интоксикации были однотипными для самцов и самок мышей и наступали преимущественно в первые 30 минут после введения, постепенно нарастая от замедленной двигательной активности, экстензорных судорог и слабо выраженного усиления взъерошенности волосяного покрова к пассивной/слабой двигательной активности, умеренно/значительно выраженному усилению взъерошенности волосяного покрова и последующей гибели части экспериментальных животных, наступающей, как правило, на 4–8 сутки эксперимента. У выживших животных наблюдалось постепенное восстановление двигательной активности, уменьшение степени выраженности взъерошенности волосяного покрова с последующим восстановлением всех регистрируемых показателей клинического состояния до

уровня условной физиологической нормы к концу периода наблюдения.

Процент выживаемости и другие показатели токсикометрии КМГС приведены в табл. 1.

В результате изучения острой токсичности при внутрибрюшинном введении КМГС в дозах 150, 225, 300 и 375 мг/кг рассчитанные уровни LD₅₀ у животных исследуемых групп выявили более низкий уровень ($p < 0,05$) данного показателя у мышей-самцов – средняя летальная доза для них составила 227,8 мг/кг (205,1÷350,5); для самок – 262,5 мг/кг (195,8÷329,2).

Рассчитанные LD₅₀ при внутрибрюшинном введении КМГС лабораторным животным позволяет отнести исследуемое вещество к IV классу токсичности (малотоксично) в соответствии с модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития OECD [6].

В ходе проведенных экспериментальных работ не выявлена тенденция к увеличению смертности особей одного пола (суммарно во всех группах) более чем на 20 %, что свидетельствует об отсутствии гендерной чувствительности.

Однократное введение КМГС самцам мышей в дозах 225 мг/кг и 375 мг/кг вызывало снижение массы тела животных к 14 суткам эксперимента. Схожая картина наблюдалась и у самок мышей в дозе 375 мг/кг (табл. 2). Снижение массы тела

Таблица 2. Динамика абсолютной массы тела животных при однократном внутрибрюшинном введении КМГС, М±m

Временная точка исследования	Доза, мг/кг			
	150	225	300	375
Самцы				
Исходные данные	23,58±0,11	23,38±0,08	22,50±0,13	22,88±0,11
7 день	25,72±0,38	22,58±0,12	21,98±0,51	22,25±0,45
14 день	27,96±0,67	22,83±0,41	23,03±0,15	20,30*
Прирост на 14 день, %	18,14±2,45	-2,68±1,41	2,53±0,91	-9,78*
Самки				
Исходные данные	23,38±0,33	22,30±0,34	24,95±0,27	22,55±0,18
7 день	22,92±0,36	21,28±1,22	23,43±1,80	21,53±0,39
14 день	24,38±0,61	22,60±1,24	25,55±1,55	21,10*
Прирост на 14 день, %	4,79±1,59	2,21±5,81	1,51±4,35	-7,46*

П р и м е ч а н и е: * – значение, полученное от одного животного.

животных в 1 неделю наблюдения, вероятно, обусловлено нарастанием общей интоксикации организма в ответ на внутрибрюшинное введение КМГС. К окончанию исследования (14 сутки наблюдения) клиническое состояние большинства животных стабилизировалось, и отмечался положительный прирост массы тела относительно исходных значений.

При вскрытии павших животных установлены признаки выраженного расстройства кровообращения в различных органах и тканях. Обнаружено полнокровие сосудов кожи и подкожной клетчатки, а также ярёмных и подмышечных вен; выявлено выраженное полнокровие органов брюшной и тазовой полостей, сосудов брыжейки, тела и рогов матки, лёгочных вен, а также сосудов полушарий головного мозга. Полости желудочков сердца и, в большей степени, предсердий переполнены темной густой кровью. Почки бледные, на разрезе мозговое вещество окрашено в тёмно-бордовый цвет. Легкие эластичны, воздушны, на разрезе обычной окраски; дыхательные пути свободны. На поверхности яичников самок, надпочечников и тимуса мышей обоих полов выявлены точечные

кровоизлияния. При вскрытии обнаружился выпот в брюшной полости. Наблюдался незначительный спаечный процесс между долями печени и сальником, при этом у большинства животных печень имела плотную консистенцию и естественный цвет.

При вскрытии животных в ходе запланированной некропсии (по окончании периода наблюдения) отмеченные изменения также имели место, но были выражены в меньшей степени.

Средние значения весовых коэффициентов основных органов жизнеобеспечения мышей по сериям эксперимента приведены в табл. 3.

В результате исследования установлено, что внутрибрюшинное введение КМГС не влияло на весовые коэффициенты легких, селезенки и почек экспериментальных животных обоих полов на протяжении всего периода наблюдений. Увеличение весового коэффициента печени у самцов мышей на 9,4 %, 4,5 % и 9,1 % регистрировали при введении лекарственного средства в дозах 225 мг/кг, 300 мг/кг и 375 мг/кг, соответственно, по сравнению с аналогичным показателем у кон-

Таблица 3. Изменение весовых коэффициентов внутренних органов мышей при изучении острой токсичности КМГС, $M \pm m$

Серия эксперимента	Сердце	Легкие	Печень	Селезенка	Почки
Самцы					
Контроль	0,56±0,02	0,85±0,04	5,83±0,12	0,68±0,02	1,65±0,08
150 мг/кг	0,49±0,03	0,78±0,03	5,44±0,23	0,69±0,07	1,49±0,07
225 мг/кг	0,50±0,02	1,20±0,23	6,38±0,10*	0,86±0,14	1,50±0,08
300 мг/кг	0,55±0,04	0,87±0,05	6,09±0,13	0,81±0,07	1,42±0,08
375 мг/кг	0,58±0,05	0,76±0,02	6,36±0,11*	0,92±0,17	1,41±0,07
Самки					
Контроль	0,56±0,02	0,93±0,10	5,30±0,41	0,76±0,14	1,21±0,07
150 мг/кг	0,51±0,03	0,94±0,08	5,21±0,09	0,76±0,07	1,30±0,03
225 мг/кг	0,58±0,06	0,94±0,09	5,67±0,16	0,67±0,03	1,32±0,16
300 мг/кг	0,48±0,03*	0,99±0,07	5,50±0,09	0,65±0,03	1,12±0,04
375 мг/кг	0,48±0,07	1,17±0,20	5,24±0,03	0,87±0,11	1,12±0,09

Примечание: * – достоверность различий по сравнению со значениями данного показателя у контрольных животных по *t*-критерию Стьюдента, при $p < 0,05$.

трольных животных. Кроме этого, для самок мышей в дозе 300 мг/кг показано достоверное снижение относительной массы сердца на 14,3 % по отношению к контролю.

Заключение

В ходе изучения острой токсичности нового комплексного местного гемостатического средства на основе неорганических солей при внутрибрюшинном введении беспородным мышам установлено следующее:

1. LD₅₀ для самцов составляет 227,8 мг/кг (205,1÷350,5); для самок – 262,5 мг/кг (195,8÷329,2); гендерная чувствительность отсутствует;

2. Клинические проявления интоксикации были однотипными для самцов и самок мышей, в основном заключались в замедлении двигательной активности животных и наиболее проявлялись в первые часы после введения КМГС;

3. Снижение массы тела животных в течение всего периода наблюдений регистрировали только при введении препарата в наибольшей тестируемой дозе (375 мг/кг);

4. Макроскопическое исследование ряда внутренних органов (сердце, почки, селезенка, легкие) самцов и самок мышей всех экспериментальных серий не выявило существенных различий в консистенции, окраске и размерах по сравнению с контролем. Наблюдался небольшой спаечный процесс между долями печени и салеником, при этом печень была плотной консистенции и имела естественный цвет. При вскрытии брюшной полости животных опытных серий обнаруживался выпот;

5. У самцов мышей при введении препарата в дозах 225 мг/кг, 300 мг/кг и 375 мг/кг регистрировали незначительное изменение весового коэффициента печени – на 9,4 %, 4,5 % и 9,1 %, соответственно. Значения относительной массы основных органов жизнеобеспечения самцов и самок мышей во всем диапазоне исследованных доз не отличались от зарегистрированных в контроле.

Обобщая полученные результаты приведенного выше исследования, можно сделать вывод о том, что новое гемостатическое средство при внутрибрюшинном введении аутбредным мышам относится

к IV классу токсичности (малотоксично) и не оказывает существенного влияния на прирост массы тела, макроскопическое строение и величину весовых коэффициентов внутренних органов лабораторных животных.

Литература

1. *Проблемы гемостаза и герметизма при резециях печени с использованием фибрин-коллагеновой субстанции* / А. Г. Бунатян [и др.] // Хирургия. – 2003. – № 9. – С. 18–23.

2. *Чардаров, Н. К., Багмет Н. Н., Скипенко О. Г. Местные гемостатики в хирургии печени* / Н. К. Чардаров, Н. Н. Багмет, О. Г. Скипенко // Хирургия. – 2009. – № 2. – С. 18–23.

3. *Аппликационное средство гемостаза при капиллярно-паренхиматозном кровотечении* / Г. Г. Белозерская [и др.] // Хирургия. – 2004. – № 9. – С. 55–59.

4. *Гапанович, В. Н. Лекарственные средства для местного применения в форме растворов, зарегистрированные в Республике Беларусь* / В. Н. Гапанович, С. В. Андреев, Д. Р. Мицкий // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2021. – № 20 (1S). – С. 19. – doi:10.15829/1728-8800-2021-1S.

5. *Изучение безопасности (переносимости) нового гемостатического средства Гамастат при аппликации на печень крыс линии Вистар* / В. Н. Гапанович [и др.] // Мед. журн. – 2015. – № 2. – С. 129–135.

6. *Технический кодекс устоявшейся практики ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика»*. Издание официальное. Утвержден и введен в действие постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.03.2008 № 56. – Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2008. – 35 с.

7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* / Р. У. Хабриев [и др.]; под ред. Р. У. Хабриева. – М.: ЗАО ИИА «Медицина», 2005. – 892 с.

8. *Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1* / А. Н. Миронов [и др.]. – М.: Гриф и К, 2013. – 328 с. – ISBN: 978-8125-1858-5.

9. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910.

References

1. *Problemy gemostaza i germetizma pri rezekciyah pecheni s ispol'zovaniem fibrin-kollagenovoy substancii* / A. G. Bunatyan [i dr.] // Hirurgiya. – 2003. – № 9. – S. 18–23.

2. *Chardarov, N. K., Bagmet N. N., Skipenko O. G. Mestnye gemostatiki v hirurgii pecheni* / N. K. Chardarov, N. N. Bagmet, O. G. Skipenko // Hirurgiya. – 2009. – № 2. – S. 18–23.

3. *Applikacionnoe sredstvo gemostaza pri kapil'lyarno-parenhimatoznom krvotechenii* / G. G. Belozerskaya [i dr.] // Hirurgiya. – 2004. – № 9. – S. 55–59.

4. *Gapanovich, V. N. Lekarstvennye sredstva dlya mestnogo primeneniya v forme rastvorov, zaregistrirovannye v Respublike Belarus'* / V. N. Gapanovich, S. V. Andreev, D. R. Mikickij // Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika, 2021. – № 20 (1S). – S. 19. – doi:10.15829/1728-8800-2021-1S.

5. *Izuchenie bezopasnosti (perenosimosti) novogo gemostaticheskogo sredstva Gamastat pri aplikacii na pechen' krys linii Vistar* / V. N. Gapanovich [i dr.] // Med. zhurn. – 2015. – № 2. – S. 129–135.

6. *Tekhnicheskij kodeks ustoyavshejsya praktiki TKP 125-2008 «Nadlezhachaya laboratornaya praktika»*. Izdanie oficial'noe. Utverzhden i vveden v dejstvie postanovleniem Ministerstva zdravooohraneniya Respubliki Belarus' ot 28.03.2008 № 56. – Minsk: Ministerstvo zdravooohraneniya Respubliki Belarus', 2008. – 35 s.

7. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv* / R. U. Habriev [i dr.]; pod red. R. U. Habrieva. – M.: ZAO IIA «Medicina», 2005. – 892 s.

8. *Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom 1* / A. N. Mironov [i dr.]. – M.: Grif i K, 2013. – 328 s. – ISBN: 978-8125-1858-5.

9. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910.

Поступила 20.05.2025 г.