

**БЫЧИЧКО ДМИТРИЙ ЮРЬЕВИЧ**

**РАЗРАБОТКА ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ ПОКРЫТИЙ ЛОКАЛЬНОГО  
ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ НАТУРАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ:  
АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И КАППА-КАРРАГИНАНА  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

**3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология  
(медицинские науки)**

**Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук**

**Москва – 2022**

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.**

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук

**Белозерская Галина Геннадьевна**

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор

**Липатов Вячеслав Александрович**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии имени профессора А. Д. Мясникова, профессор кафедры, заведующий лабораторией экспериментальной хирургии и онкологии НИИ экспериментальной медицины.

Доктор медицинских наук

**Купряшов Алексей Анатольевич**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел клинической и производственной трансфузиологии с диагностической лабораторией, заведующий отделом врач-трансфузиолог.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_:\_\_ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.01 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1) и на сайте <https://www.rsmu.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года.

**Учёный секретарь диссертационного совета:**

доктор медицинских наук, профессор



**Духанин Александр Сергеевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Некомпенсированная кровопотеря являлась и по сей день является одной из ведущих причин смертности населения в результате травматизации (Rossaint R. et al., 2016), применения антикоагулянтов (Тарасов В. В и др., 2019), осложнений во время плановых и экстренных операционных вмешательствах (Адианов В. В и др., 2014), родов (Жаркин Н. А. и др., 2014) и других неотложных состояний (Дыгов Э. А. и др., 2015), поэтому одной из важнейших проблем современной медицины является остановка кровотечения и уменьшение кровопотери. Кровотечение в хирургической практике остаётся одной из самых сложных и недостаточно решённых проблем. Это связано с тем, что уровень летальности при данном виде патологии до настоящего времени остаётся высоким. В экономически развитых странах травматизм занимает 3–4 место в рейтинге летальности, а в России смертность от травм среди лиц трудоспособного возраста занимает первое место в общей структуре летальности и составляет 52 %. При этом летальность, причиной которой была острая массивная кровопотеря, составляет от 13,5 до 59,0 % (Пономарев С. В. и др., 2016). В то же время, кровопотеря в 90 % случаях является основной причиной смерти военнослужащих и сотрудников силовых ведомств во время боевых действий (Stuart S. M. et al., 2019). Для снижения риска смертельного исхода от осложнений, связанных с кровопотерей, современная хирургия использует специальные гемостатические материалы местного применения, способные эффективно останавливать кровотечения там и тогда, когда применение коагуляционных электрохирургических систем нежелательно для пациента (Богдан В. Г. и др., 2007). Особое внимание уделяется местным гемостатическим средствам, которые эффективно действуют в локальных зонах и могут быть использованы в случаях диффузной кровоточивости (раневая поверхность паренхиматозных органов, губчатая ткань и др.), когда другие методы остановки кровотечений могут быть малоэффективными. На сегодняшний день существует набор гемостатических средств различного химического строения и механизмов действия, а также комбинированных препаратов для местной остановки кровотечений. Анализ литературных данных выпускаемых гемостатических зарубежных и отечественных препаратов показал, что на российском рынке наблюдается снижение количества отечественных гемостатиков, что определяет актуальность данного исследования (Баландина Л., 2019).

### Цель исследования

Создание новых гемостатических покрытий локального действия на основе альгината натрия и каппа-каррагинана.

### **Задачи исследования**

1. Провести оценку локальной гемостатической активности покрытий на основе альгината натрия в форме губки и каппа-каррагинана в формах порошка, раствора, геля и губки;
2. Оценить влияние введения пластификаторов в состав покрытия в форме губки на гемостатическую активность и структуру образцов на основе альгината натрия;
3. Определить зависимость локальной гемостатической активности от физико-химических свойств покрытий в форме губки на основе альгината натрия и каппа-каррагинана;
4. Изучить влияние дополнительных веществ, введённых в структуру покрытий в форме губки на основе альгината натрия, на гемостатическую активность;
5. Сопоставить гемостатическую активность покрытий на основе каппа-каррагинана *in vivo* и *in vitro*;
6. Провести сравнительную оценку локальной гемостатической активности покрытий в форме губки на основе альгината натрия и каппа-каррагинана с гемостатической активностью известных кровоостанавливающих средств.

### **Научная новизна**

1. Созданы новые патентоспособные гемостатические композиции локального действия на основе альгината натрия в форме губки и каппа-каррагинана в формах порошка и губки;
2. Исследовано влияние дополнительных агентов, введённых в структуру покрытий в форме губки, на гемостатическую активность новых покрытий на основе альгината натрия;
3. Проведено сопоставление гемостатической активности новых покрытий в форме губки на основе каппа-каррагинана *in vitro* и *in vivo*.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Созданы новые как моно-, так и комбинированные отечественные локальные покрытия для проведения дальнейших испытаний (токсикологических, клинических);
2. Проведена оценка специфической фармакологической активности разрабатываемых гемостатических покрытий на основе альгината натрия и каппа-каррагинана;
3. Исследовано влияние дополнительных агентов, введённых в структуру разрабатываемых покрытий, которые могут расширить ассортимент гемостатических средств локального действия, сферы их применения, что может лечь в основу создания новой линейки локальных гемостатических препаратов (патенты RU 2627855 C1, RU 2639379 C1, RU 2652270 C1);
4. Доказано, что содержание каппа-каррагинана в составе губки при нейтральном pH (растворитель — дистиллированная вода) после контакта с кровью *in vitro* мало влияет на содержание основных субстратов свёртывания крови — тромбоцитов и фибриногена, а содержание каппа-каррагинана в составе губки при кислом pH (растворитель — 0,5 % уксусная

кислота) после контакта с кровью приводит к гиперкоагуляционному сдвигу с сопутствующим усилением генерации тромбина;

5. С учётом полученных данных *in vivo* и *in vitro* показано, что применение образцов в форме губки на основе каппа-каррагинана в 0,5 % уксусной кислоте ускоряет процесс образования первичного тромба, при этом сформировавшийся сгусток имеет более плотную структуру за счёт связывания значительного количества тромбоцитов и фибрина с контактной поверхностью образцов, которая выступает «подходящей» матрицей для процессов тромбообразования (патенты RU 2695075 C1, RU 2701195 C1).

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты проведённых исследований были внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории патологии и фармакологии гемостаза ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и ООО фирма «Технология-Стандарт».

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработанные покрытия в форме губки на основе альгината натрия в чистом виде и в композиции с пластифицирующими и активными веществами на основе солей металлов имеют высокую гемостатическую активность;
2. Исследованиями *in vivo* доказано, что каппа-каррагинан в формах порошка и губки обладает выраженной локальной гемостатической активностью, а в композиции с 0,5 % уксусной кислотой вызывает гиперкоагуляционный сдвиг показателей параметров гемостаза *in vitro*;
3. Гемостатическая активность локальных покрытий, разработанных на основе природных полимеров (альгината натрия и каппа-каррагинана) не уступает гемостатической активности локальных гемостатических средств, имеющихся в аптечной сети.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности проведённого исследования подтверждена достаточным числом наблюдений, рациональным формированием групп сравнения, соблюдением критериев включения и исключения из исследования. Использованные методы статистической обработки соответствуют современным требованиям. Научные выводы и практические рекомендации основаны на достоверных результатах, представленных на рисунках и в таблицах.

Апробация диссертации проведена на заседании Проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» (протокол № 10 от 26.10.2020 года).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на следующих научных мероприятиях:

1. V съезд фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Россия, г. Ярославль, 2018);
2. V Конгресс гематологов России (Россия, г. Москва, 2020);
3. Российский форум по тромбозу и гемостазу совместно с 10-ой Всероссийской (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Россия, г. Москва, 2020).

### **Публикации**

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 7 научных статьях и тезисах докладов, в том числе в 4 публикациях в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций. Дополнительно по теме диссертационной работы было получено 5 патентов на изобретения.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в разработке дизайна исследования, принимал участие в острых экспериментах на животных, выполнял физико-химические и лабораторные исследования, непосредственно проводил систематизацию и обработку полученных результатов, участвовал в подготовке статей и патентов к публикации.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 186 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования и 2 главы результатов собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего в себя 327 источников (135 отечественных и 192 зарубежных). Работа иллюстрирована 40 таблицами и 57 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В работе использовали растворы альгината натрия (препарат «Натальгин») производства ОАО «Архангельский опытный водорослевый комбинат», молекулярная масса которого составляла 70 kDa, и каппа-каррагинана (Bengel MBF-2000), молекулярная масса которого составляла порядка 78–100 kDa, производства Shemberg Corporation, Филиппины. Дистиллированная вода, 0,5 % раствор уксусной (ООО АО «РЕАХИМ», Россия) и молочной кислот (Продукт NESPRESSO, ООО «Нестле Россия», Россия) (0,5 % УК и 0,5 % МК) использовали в качестве растворителей. В качестве активных добавок, вводимых в структуру покрытий, использовали порошок природного цеолита (ООО «Цео-Макс», Россия), микро- и наночастицы (НЧ) оксидов металлов смешанного состава (произведены в ФГАОУ ВО «НИ

Томский Политехнический университет») и неорганические соли: соль Мора, карбонат лития и сульфат железа II (ООО «ПраймКемикалсГрупп», Россия). Были использованы следующие пластифицирующие вещества: глицерин (Тульская фармацевтическая фабрика, Россия), глицин, глюкоза, полиэтиленгликоль (ПЭГ), диметилсульфоксид (ДМСО), сорбитол, маннитол (ИМ «Химпроцесс», Россия). Исследуемые локальные гемостатические покрытия в форме губки были разработаны и производственно исполнены в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в лаборатории патологии и фармакологии гемостаза совместно с опытно-производственным отделом глубокой переработки плазмы (заведующий отделом: Е. М. Голубев).

Экспериментальная часть работы выполнена на 90 кроликах породы «Шиншилла» обоего пола массой 3,0–4,5 кг, которые были распределены по группам в соответствии с задачами исследования. Все эксперименты проводились в соответствии с действующим законодательством, Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986 года, г. Страсбург) и заключением локального этического комитета. Определение гемостатической активности (ГА) исследуемых покрытий проводили по методике, представленной в рекомендованном Фармкомитетом для доклинической оценки гемостатического действия потенциальных лекарственных средств «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012).

Основным критерием эффективности гемостатического покрытия в экспериментах *in vivo* была принята ГА, %, которая вычислялась по формуле:

$$ГА = \frac{ГА_t + ГА_v}{2},$$

где  $ГА_t$  — ГА по времени остановки кровотечения (ВОК),  $ГА_v$  — ГА по объёму кровопотери (ОК):

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

где  $t_2$ , с — ВОК при наложении исследуемого образца на раневую поверхность,  $t_1$ , с — ВОК при наложении марлевого тампона на раневую поверхность (контроль);

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

где  $V_2$ , мл — объём кровопотери при наложении исследуемого образца на раневую поверхность,  $V_1$ , мл — объём кровопотери при наложении марлевого тампона на раневую поверхность (контроль).

Оценку физико-химических свойств проводили по четырём методикам. Поглонительную способность в дистиллированной воде (ДВ/DW)  $V_{DW}$ , % и физиологическом растворе (ФР/PS)  $V_{PS}$ , % вычисляли по формуле:

$$B_{DW/PS} = \frac{m_{DW/PS} - m_0}{m_0} \times 100 \%,$$

где  $m_{DW/PS}$ , г — масса полностью пропитанного покрытия ДВ или ФР,  $m_0$ , г — масса сухого покрытия до погружения в ДВ или ФР.

Время смачивания в ДВ или ФР ( $t_{DW/PS}$ , с) определяли по секундомеру.

Пористость покрытий (П, %) измеряли в этиловом спирте и рассчитывали по формуле:

$$П = \frac{\rho_c \pi r^2 d}{m_c - m_0} \times 100 \%,$$

где  $\rho_c$ , г/см<sup>3</sup> — плотность этилового спирта (0,811 г/см<sup>3</sup>),  $r$ , см — радиус исследуемого покрытия,  $d$ , см — толщина покрытия,  $m_c$ , г — масса покрытия после пропитывания этиловым спиртом,  $m_0$ , г — масса сухого покрытия до контакта с этиловым спиртом.

Плотность покрытий ( $\rho$ , г/см<sup>3</sup>) вычисляли по формуле:

$$\rho = \frac{m_0}{\pi r^2 d} \times 100 \%,$$

где  $r$ , см — радиус исследуемого покрытия,  $d$ , см — толщина покрытия,  $m_0$ , г — масса сухого покрытия.

Исследования покрытий в форме губки с помощью оптической микроскопии (ОМ) проводили на тринокулярном микроскопе «Leica» серии «DM» (Германия) в централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (заведующая лабораторией: к.м.н. В. Н. Двирнык). Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) проводили в ФГАОУ ВО «НИ Томском Политехнический университет» на оборудовании Hitachi Tabletop Microscope TM3000 (Япония) и системы с электронными и сфокусированными пучками QUANTA 200 3D (США).

Интегральную оценку системы гемостаза *in vitro* после контакта крови с исследуемыми покрытиями проводили совместно с Алтайским филиалом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, г. Барнаул (директор: д.м.н., профессор А. П. Момот) с использованием тестов: подсчёт количества тромбоцитов, определение плазменной концентрации фибриногена, тест генерации тромбина (ТГТ), тромбоэластометрия (ТЭМ).

Статистический анализ полученных данных проводили, используя непарный *t*-критерий (критерий Стьюдента), а также применяли двусторонний *U*-критерий (критерий Мана-Уитни). Проверка гипотезы о нормальном распределении осуществлялась при использовании критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при уровнях значимости от 95 % ( $p < 0,05$ ). Все полученные результаты представлены на графиках в формате  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое из результатов измерений,  $\sigma$  — стандартное квадратичное отклонение.

## Результаты исследования

Исследования диссертационной работы проводили по семи направлениям. В рамках первого направления изучалась зависимость ГА покрытий в форме губок, изготовленных из растворов альгината натрия, от массовой доли альгината натрия (1,0, 2,0 3,0 4,0 и 5,0 %) с использованием в качестве растворителя ДВ. По результатам экспериментов первого направления были выбраны лучшие образцы для дальнейшей модификации с целью усиления гемостатического эффекта и удобства применения.

Следующим направлением было изучение влияния пластифицирующих веществ (полисорбат, сорбитол, маннитол, ДМСО, глицин, ПЭГ, глюкоза и глицерин) на свойства покрытий в форме губки на основе альгината натрия. В результате были определены оптимальные добавки для улучшения пластичности покрытий, а также для усиления ГА.

Задачей третьего направления было изучение влияния применяемого растворителя (ДВ, 0,5 % УК и 0,5 % МК) на ГА разработанных покрытий в форме губки на основе альгината натрия и на физико-химические свойства образцов в форме губки по шести исследуемым параметрам (время смачивания в ДВ и ФР, степень водопоглощения в ДВ и ФР, пористость и плотность).

Четвёртым направлением явилось исследование возможности усиления ГА альгинатных покрытий в форме губки посредством добавления в их состав активных соединений на основе металлов (цеолит, неорганические соли и НЧ оксидов железа различного фазового состава).

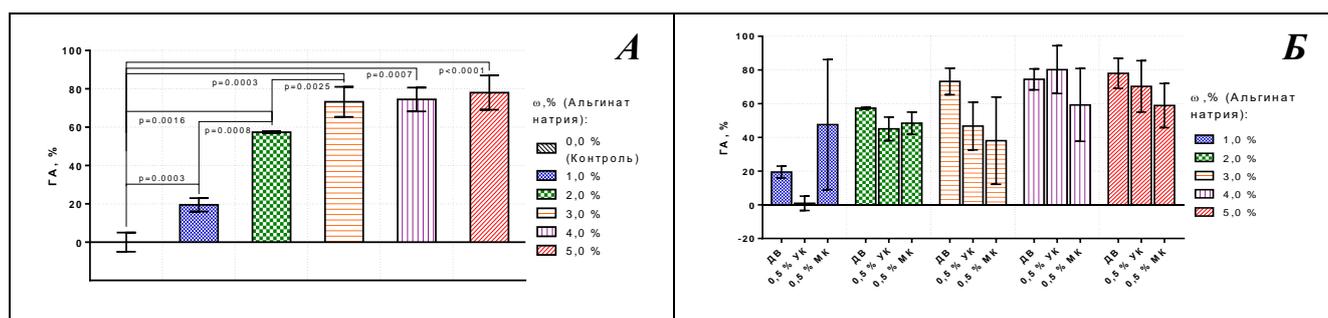
Пятым направлением диссертационной работы было исследование ГА каппа-каррагинана в различных фармакологических формах и в различном количестве (порошки: 100, 150, 200 и 300 мг, растворы и гели на водной основе: 0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 %). Впоследствии для дальнейших изучений из приготовленных гелей и растворов были созданы новые покрытия в форме губок.

Задачей шестого направления было изучение ГА покрытий в форме губки, изготовленных из растворов каппа-каррагинана в концентрациях 0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 %, с использованием в качестве растворителей ДВ, 0,5 % УК и 0,5 % МК и проведение исследований физико-химических свойств данных покрытий.

Седьмым направлением данной работы было проведение коагулологических тестов *in vitro* (определение основных субстратов свёртывания крови, ТГТ и ТЭМ) с участием покрытий в форме губки на основе каппа-каррагинана с целью поиска возможного механизма гемостатического действия этих образцов. Проведение сравнительной оценки ГА разработанных покрытий в форме губки на основе альгината натрия и каппа-каррагинана с ГА зарубежных препаратов.

**Определение ГА покрытий в форме губки на основе альгината натрия при использовании в качестве растворителя ДВ, 0,5 % УК и 0,5 % МК.**

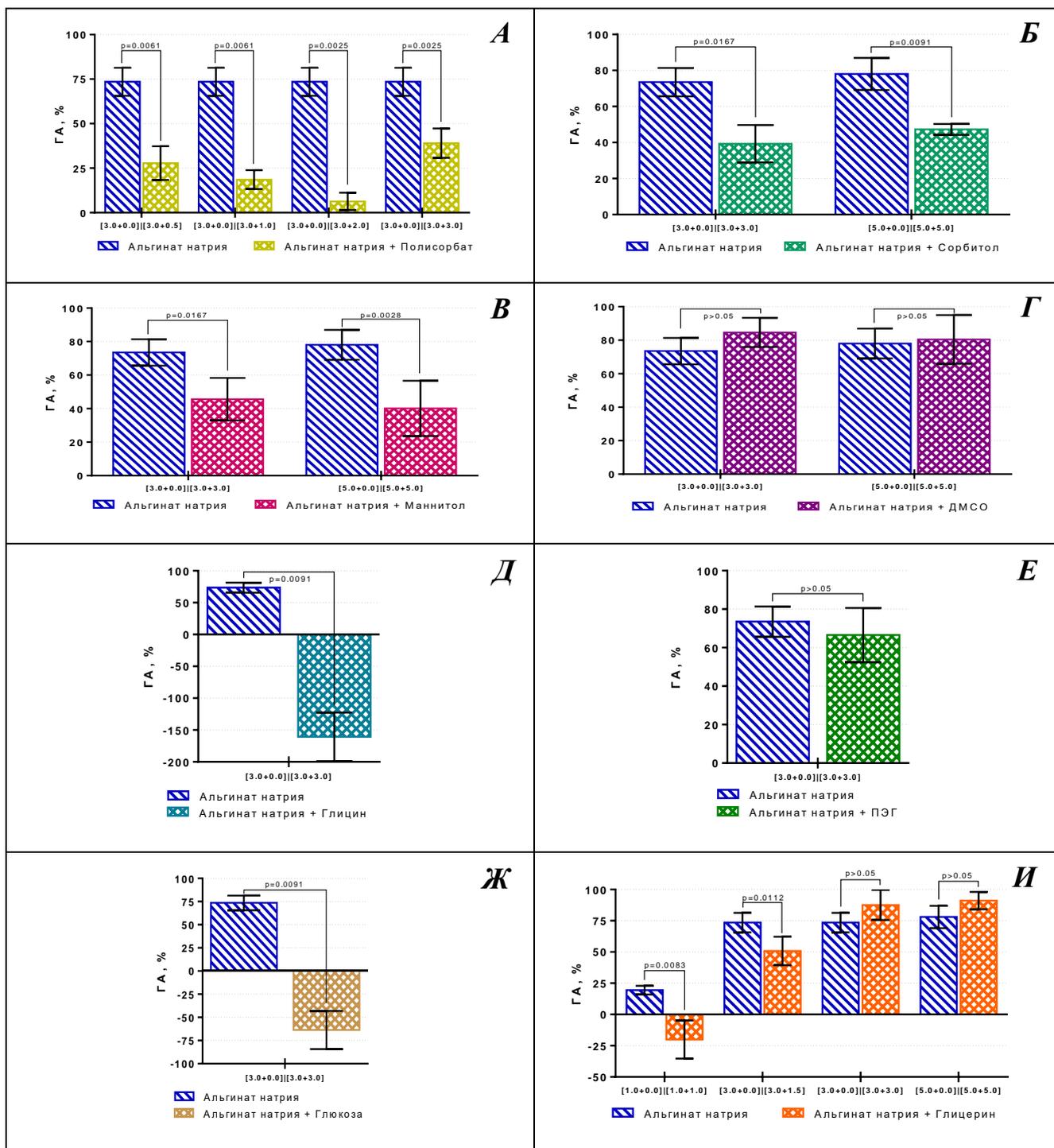
Показано, что с увеличением концентрации альгината натрия в первичном растворе с 1,0 до 3,0 % ГА резко увеличивалась с  $19,41 \pm 3,51$  до  $73,50 \pm 7,86$  % соответственно. Образцы, приготовленные из растворов альгината натрия с концентрациями 3,0, 4,0 и 5,0 %, обладали высокой, сопоставимой между собой, ГА ( $73,50 \pm 7,86$ ,  $74,44 \pm 6,18$  и  $78,03 \pm 8,92$  % соответственно) (Рис. 1А). По результатам экспериментов для дальнейшей модификации были выбраны образцы, содержащие от 3,0 до 5,0 % альгината натрия. Из анализа данных (Рис. 1Б) можно заключить, что высокой ГА обладали образцы в форме губки на основе 3,0 и 5,0 % растворов альгината натрия в ДВ и 4,0 % раствора с использованием ДВ и 0,5 % УК в качестве растворителей:  $73,50 \pm 7,86$ ,  $78,03 \pm 8,92$ ,  $74,44 \pm 6,18$  и  $80,20 \pm 14,18$  % соответственно. Наименьшую активность показал образец в форме губки на основе 1,0 % раствора альгината натрия с использованием 0,5 % УК в качестве растворителя ( $0,90 \pm 4,27$  %). ГА остальных образцов колебалась с  $19,41 \pm 3,51$  до  $59,27 \pm 21,59$  %.



**Рисунок 1.** **А** — Зависимость ГА от массовой доли ( $\omega$ , %) альгината натрия в форме губки при применении в качестве растворителя ДВ. **Б** — Зависимость ГА в эксперименте *in vivo* от концентрации альгината натрия в образце и различных растворителей.

**Определение зависимости локальной ГА от введения в структуру покрытия в форме губки на основе альгината натрия пластифицирующих добавок**

Изучение влияния пластифицирующих веществ (полисорбат (Рис. 2А), сорбитол (Рис. 2Б), маннитол (Рис. 2В), ДМСО (Рис. 2Г), глицин (Рис. 2Д), ПЭГ (Рис. 2Е), глюкоза (Рис. 2Ж) и глицерин (Рис. 2И)) на свойства покрытий на основе альгината натрия показало, что изменение технологического процесса и добавление глицерина в структуру губки приводило к улучшению пластичности покрытия. Значения ГА ( $87,61 \pm 12,07$  и  $91,12 \pm 6,88$  %) у образцов с добавлением глицерина оказались самыми высокими по сравнению с образцами, в которых использовались иные пластифицирующие соединения. Следует отметить, что при нанесении на раневую поверхность покрытия хорошо адгезировали к ней и её краям и сохраняли свою пластичность.



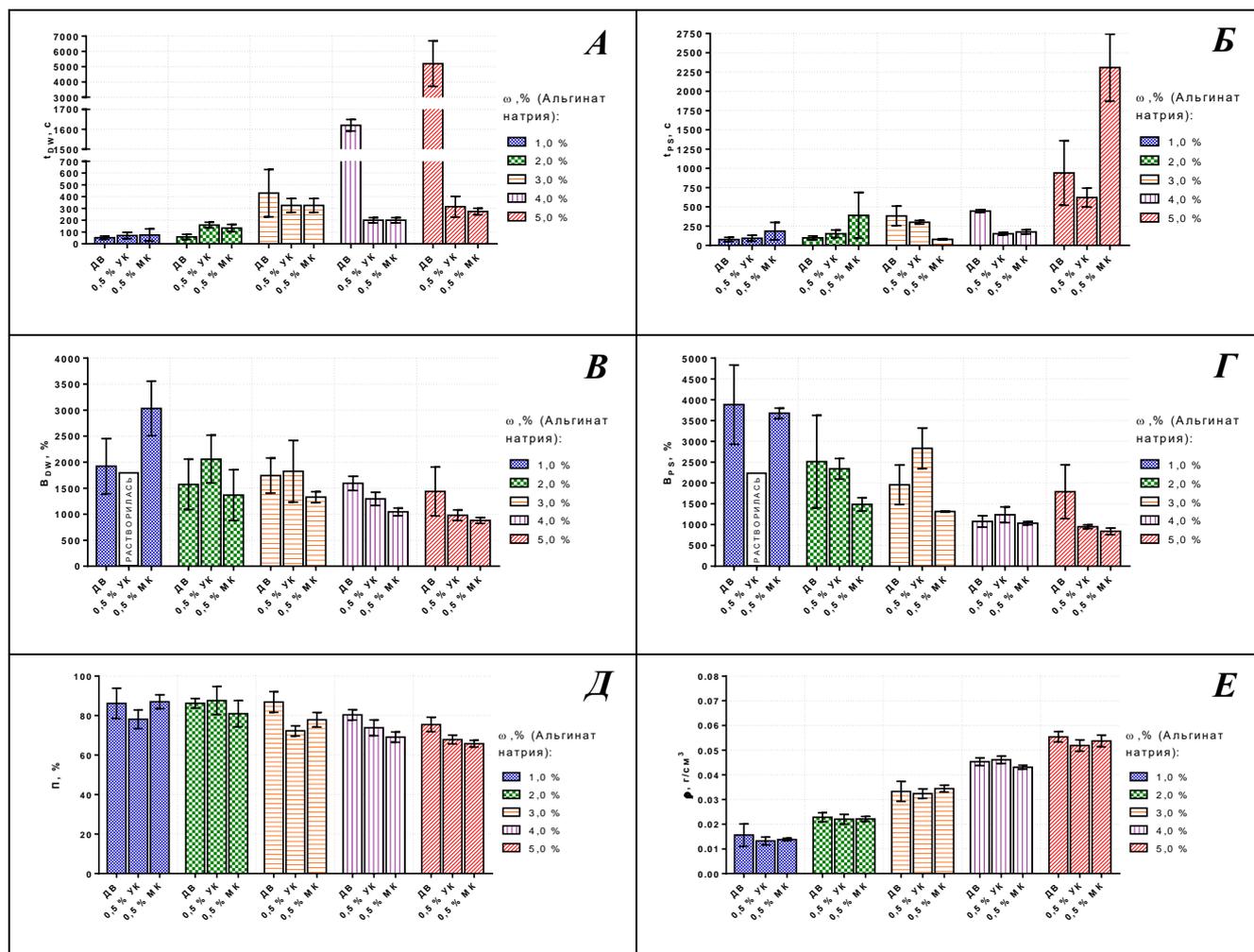
**Рисунок 2.** Сравнение ГА покрытий в форме губки, созданных из раствора чистого альгината натрия, и покрытий в форме губки, созданных из раствора альгината натрия с добавлением *А* — полисорбата, *Б* — сорбитола, *В* — маннитола, *Г* — ДМСО, *Д* — глицина, *Е* — ПЭГ, *Ж* — глюкоза, *И* — глицерина.

### *Изучение физико-химических свойств покрытий в форме губки*

#### *на основе альгината натрия с использованием различных растворителей*

Изучение физико-химических свойств покрытий в форме губки были проведены по шести исследуемым параметрам (время смачивания в ДВ (Рис. 3А) и ФР (Рис. 3Б), степень водопоглощения в ДВ (Рис. 3В) и ФР (Рис. 3Г), пористость (Рис. 3Д) и плотность (Рис. 3Е)). Самая высокая степень водопоглощения в ДВ ( $3032 \pm 524$  %) была зафиксирована у образца в

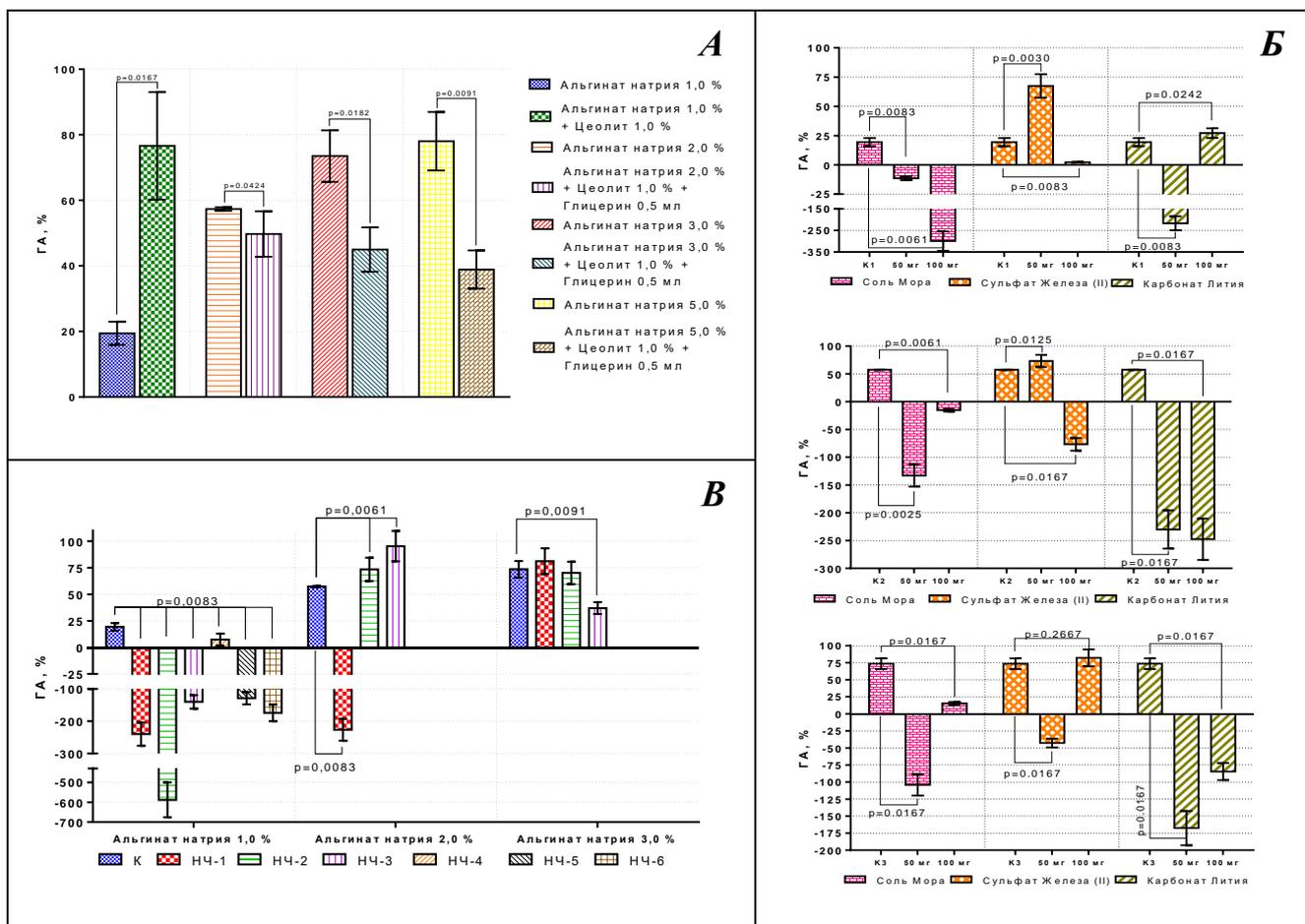
форме губки на основе 1,0 % раствора альгината натрия (растворитель – 0,5 % МК). Остальные исследуемые образцы в форме губки имели степень водопоглощения от  $979 \pm 103$  до  $1923 \pm 532$  %. Максимальными значениями водопоглотительной способности в ФР обладали покрытия в форме губки на основе 1,0 % раствора альгината натрия в ДВ ( $3883 \pm 954$  %) и 0,5 % МК ( $3675 \pm 126$  %). Анализ данных значений пористости и снимков СЭМ и ОМ покрытий показал, что все покрытия в форме губки на основе растворов альгината натрия с применением в качестве растворителей ДВ, 0,5 % УК и 0,5 % МК имели пористость от  $65,77 \pm 1,70$  до  $86,89 \pm 5,23$  %, что доказывает наличие разветвлённой пористой структуры у всех исследуемых образцов. Доказано, что плотность покрытий в форме губки на основе альгината натрия зависит только от количества альгината и не зависит от используемого растворителя. Соответственно, наибольшую плотность имели образцы в форме губки на основе 5,0 % растворов альгината натрия (от  $0,0519 \pm 0,0023$  до  $0,0554 \pm 0,0021$  г/см<sup>3</sup>), а наименьшую — на основе 1,0 % растворов (от  $0,0132 \pm 0,0016$  до  $0,0156 \pm 0,0045$  г/см<sup>3</sup>).



**Рисунок 3.** Зависимость **А** — времени смачивания образцов в форме губки в ДВ ( $t_{DW}$ , с), **Б** — времени смачивания образцов в форме губки в ФР ( $t_{PS}$ , с), **В** — водопоглощения образцов в форме губки в ДВ ( $V_{DW}$ , %), **Г** — водопоглощения образцов в форме губки в ФР ( $V_{PS}$ , %), **Д** — пористости (П, %), **Е** — плотности ( $\rho$ , г/см<sup>3</sup>) образцов в форме губки от концентрации альгината натрия в образце ( $\omega$ , %) и различных растворителей.

**Определение влияния соединений на основе металлов,  
введённых в структуру покрытий на основе альгината натрия, на ГА**

Анализ результатов показал, что добавление порошка цеолита (Рис. 4А) в концентрации 1,0 % к покрытию на основе 1,0 % раствора альгината натрия приводило к увеличению ГА с  $19,41 \pm 3,51$  до  $76,60 \pm 16,41$  %. Добавление сульфата железа II (Рис. 4Б) в количестве 50 мг в структуру губки на основе 1,0 % раствора альгината натрия приводило к усилению ГА более чем в 3 раза (с  $19,41 \pm 3,51$  до  $67,40 \pm 10,11$  %). Достоверное увеличение ГА определялось и при добавлении  $\text{FeSO}_4$  в количестве 50 мг к 2,0 % раствору альгината натрия (с  $57,34 \pm 0,53$  до  $73,29 \pm 11,00$  %). При добавлении НЧ-2 и НЧ-3 (Рис. 4В и Табл. 1) в структуры образцов на основе 2,0 и 3,0 % растворов альгината натрия происходило улучшение ГА: ГА возросла с  $57,34 \pm 0,53$  до  $95,29 \pm 14,30$  % и с  $73,50 \pm 7,86$  до  $81,13 \pm 12,17$  % соответственно. Введение НЧ-5 и НЧ-6 в составе раствора для приготовления образцов вызывало некротические изменения паренхимы печени и усиление кровотечения.



**Рисунок 4.** **А** — исследование влияния цеолита на ГА образцов в форме губки на основе водных растворов альгината натрия, **Б** — исследование влияния солей металлов на ГА образцов в форме губки на основе водных растворов альгината натрия, **В** — зависимость значений ГА от состава и количества НЧ оксидов металлов, введённых в структуру альгинатных покрытий (1,0, 2,0 и 3,0 % соответственно).

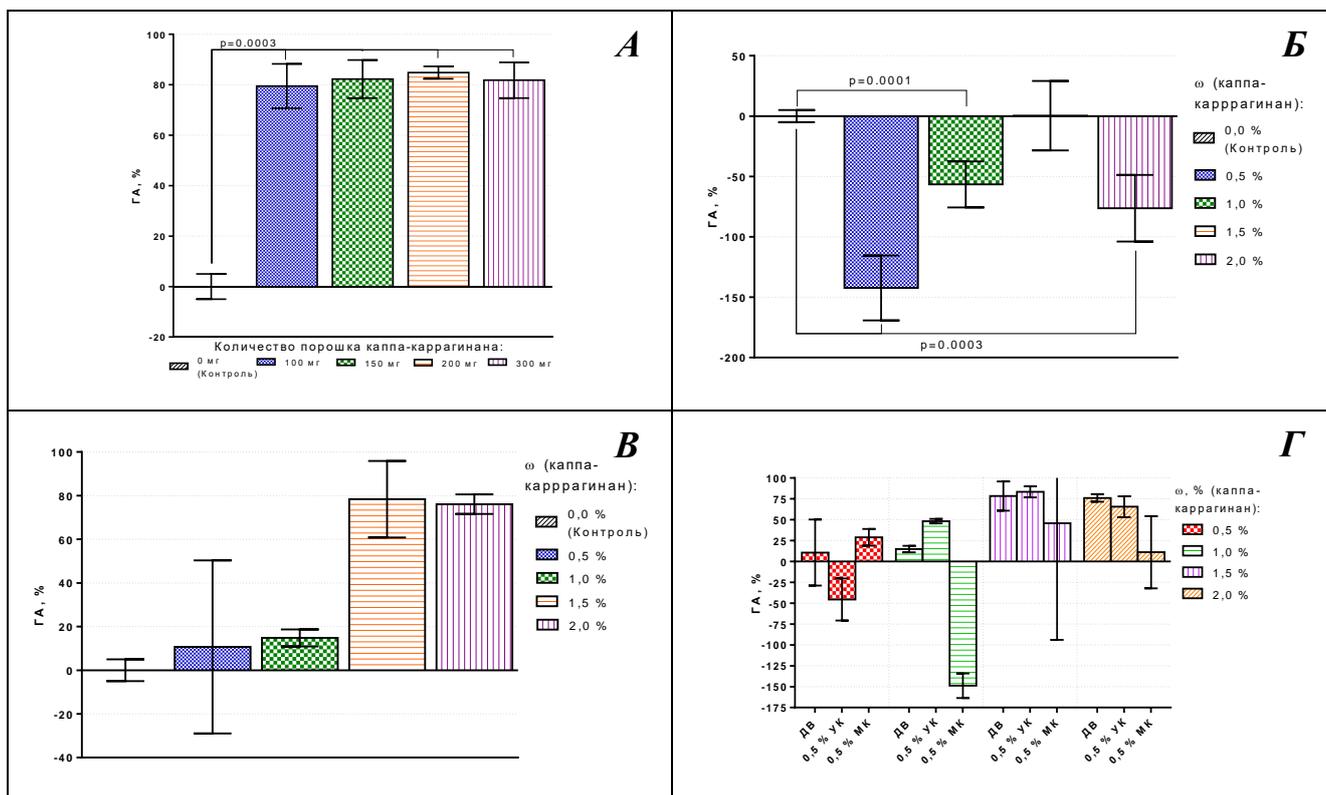
## Условные обозначения и состав наночастиц

Код	Расшифровка состава
К	Образец без наночастиц (контроль для сравнения)
НЧ-1	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 33,0\%$ ) + $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 35,0\%$ ) + $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ( $\omega = 32,0\%$ )
НЧ-2	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 74,5\%$ ) + $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 13,5\%$ ) + $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ( $\omega = 12,0\%$ )
НЧ-3	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 28,0\%$ ) + $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 18,7\%$ ) + $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ( $\omega = 53,3\%$ )
НЧ-4	$\text{ZnO}$ ( $\omega = 100,0\%$ )
НЧ-5	$\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 40,0\%$ ) + $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ( $\omega = 40,0\%$ ) + $\text{Al}$ ( $\omega = 10,0\%$ ) + $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ ( $\omega = 10,0\%$ )
НЧ-6	$\text{CuO}$ ( $\omega = 80,0\%$ ) + $\text{Cu}$ ( $\omega = 20,0\%$ )

**Определение зависимости локальной ГА от массовой доли каппа-каррагинана  
в формах порошка, раствора, геля и губки**

Изучая новые природные и синтетические полимеры, мы обратили своё внимание на широкий класс полисахаридных биополимеров под общим названием «каррагинаны». Выделяют множество типов каррагинанов (лямбда, каппа, йота, эpsilon, мю и другие), различающихся степенью сульфатирования, которая составляет от 15 до 40 %, а также молекулярной конструкцией биополимера. Также различают желирующие типы каррагинанов (каппа, йота, альфа, бета) и нежелирующие (лямбда, тета, ро), а отдельно выделяют частично циклизированные типы (мю и ню). Каррагинаны являются самыми изученными полисахаридами водорослей с точки зрения биобезопасности использования в пищевой и медицинской промышленности. В мире нет зарегистрированных препаратов, обладающих локальной гемостатической активностью, на основе каррагинана, но известно влияние каррагинанов на агрегацию тромбоцитов: только каппа-каррагинан существенно усиливал их спонтанную агрегацию. В то же время было доказано, что каппа-каррагинан обладает антибактериальным, противовирусным и антиоксидантным действиями. Учитывая эти свойства, мы впервые предложили использовать каппа-каррагинан в качестве основы локального гемостатического средства (патент RU 2652270 C1).

Исследование ГА каппа-каррагинана в формах порошка (100, 150, 200 и 300 мг (Рис. 5А)), раствора и геля на водной основе (0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 % в ДВ (Рис. 5Б)) и губки (Рис. 5В и 5Г) показало, что каппа-каррагинана в форме порошка во всех исследуемых дозах обладал высокой локальной ГА от 79,48±8,82 % до 81,81±7,08 %. Каппа-каррагинан в формах раствора и геля не адгезировал к раневой поверхности и смывался с неё током крови, что приводило к резкому снижению ГА вплоть до -142,31±26,89 %. Использование в качестве растворителя 0,5 % УК показало, что у покрытий на основе 1,0 % каппа-каррагинана ГА возрастала в 3,1 раза по сравнению с образцами покрытий, растворителем в которых использовалась ДВ. ГА покрытий на основе 1,5 и 2,0 % каппа-каррагинана с применением в качестве растворителя 0,5 % УК (ГА=83,50±6,68 и 65,56±12,49 % соответственно) и ДВ (ГА=78,38±17,52 и 76,09±4,49 % соответственно) была сопоставима.



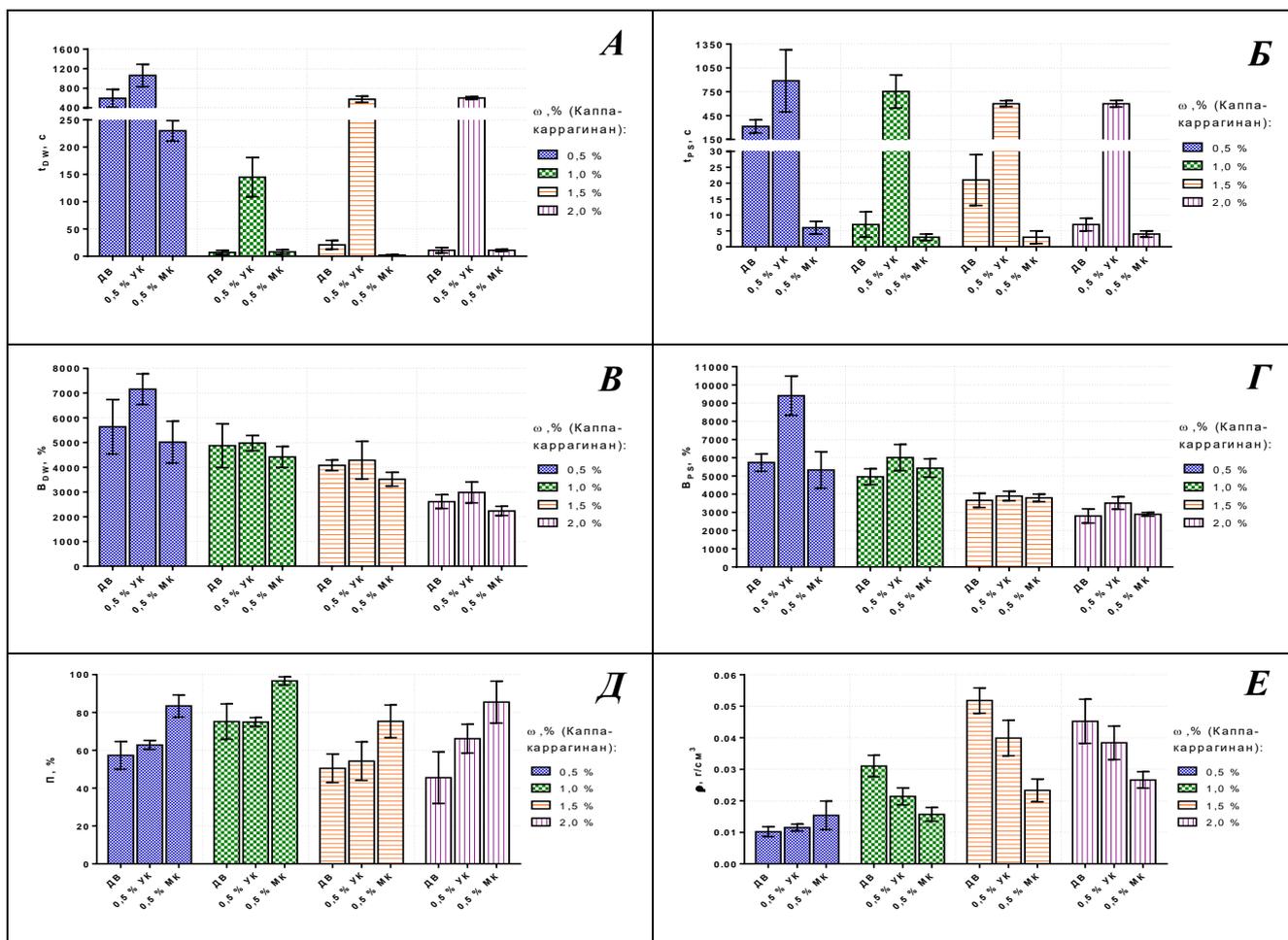
**Рисунок 5.** *А* — сравнительное исследование ГА различных доз порошка каппа-каррагинана, *Б* — зависимость ГА от концентрации каппа-каррагинана в формах раствора и геля, *В* — зависимость ГА от массовой доли каппа-каррагинана в образцах форме губки при применении в качестве растворителя ДВ, *Г* — сравнительное исследование ГА покрытий в форме губки на основе различных доз и различных растворителей каппа-каррагинана.

### *Изучение физико-химических свойств покрытий на основе каппа-каррагинана с использованием различных растворителей*

Для комплексной оценки свойств покрытий с различным содержанием каппа-каррагинана с использованием в качестве растворителей ДВ, 0,5 % УК и 0,5 % МК мы провели исследование физико-химических характеристик (время смачивания в ДВ (Рис. 6А) и ФР (Рис. 6Б), степень водопоглощения в ДВ (Рис. 6В) и ФР (Рис. 6Г), пористость (Рис. 6Д) и плотность (Рис. 6Е)).

Из представленных данных можно заключить, что максимальное время смачивания в ДВ было у всех образцов, растворителем в которых была 0,5 % УК вне зависимости от массовой доли каппа-каррагинана (от  $145 \pm 36$  до  $1062 \pm 229$  с) и у образцов, изготовленных на основе 0,5 % растворов каппа-каррагинана вне зависимости от растворителя. Самое высокое значение времени смачивания в ФР было зафиксировано у покрытий с использованием в качестве растворителя 0,5 % УК (от  $600 \pm 37$  до  $888 \pm 391$  с). Время смачивания в ФР остальных покрытий происходило менее чем за 10 с. Водопоглотительная способность в ДВ у исследуемых покрытий постепенно снижалась с увеличением массовой доли каппа-каррагинана и не зависела от выбранного растворителя. Максимальной водопоглотительной способностью в ДВ обладали образцы на основе 0,5 % каппа-каррагинана (от  $5015 \pm 843$  до  $7159 \pm 620$  %), а минимальной — на основе 2,0 % (от  $2235 \pm 186$  до  $2983 \pm 421$  %). Высокими значениями водопоглотительной

способностью в ФР обладало покрытие на основе 0,5 % каппа-каррагинана с применением 0,5 % УК в качестве растворителя ( $9404 \pm 1081$  %). При исследовании значений водопоглотительной способности в ФР остальных образцов была выявлена тенденция, схожая со значениями водопоглощением в ДВ. Все исследуемые покрытия обладали развитой пористой структурой, что подтверждали фотографии, полученные с помощью метода ОМ, и результаты физико-химических исследований. Значения плотности покрытий в форме губки на основе каппа-каррагинана зависят от его массовой доли. С увеличением массовой доли каппа-каррагинана от 0,5 до 1,5 % плотность возрастает в среднем в 2 раза (при использовании ДВ: от  $0,0102 \pm 0,0016$  до  $0,0518 \pm 0,0040$  г/см<sup>3</sup>, при использовании 0,5 % УК: от  $0,0115 \pm 0,0011$  до  $0,0399 \pm 0,0056$  г/см<sup>3</sup> соответственно). Доказано, что выбор растворителя оказывал влияние на плотность покрытия, при этом в группах с одинаковой концентрацией каппа-каррагинана более 0,5 % наименьшую плотность имели образцы, для изготовления которых применяли 0,5 % МК в качестве растворителя, а наибольшую при использовании ДВ.



**Рисунок 6.** Зависимость *A* — времени смачивания образцов в форме губки в ДВ ( $t_{DW}$ , с), *B* — времени смачивания образцов в форме губки в ФР ( $t_{PS}$ , с), *V* — водопоглощения образцов в форме губки в ДВ ( $V_{DW}$ , %), *G* — водопоглощения образцов в форме губки в ФР ( $V_{PS}$ , %), *D* — пористости (П, %), *E* — плотности ( $\rho$ , г/см<sup>3</sup>) образцов в форме губки от концентрации каппа-каррагинана в образце ( $\omega$ , %) и различных растворителей.

***Сравнительное исследование влияния массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей на показатели коагулологических тестов в экспериментах *in vitro****

Нами совместно с Алтайским филиалом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, г. Барнаул (директор: д.м.н., профессор А. П. Момот) были разработаны тест-система и способ получения покрытий в форме губки в микропробирках для исследования *in vitro* влияния локальных гемостатических покрытий в различных формах на такие показатели гемостаза, как число тромбоцитов (Рис. 7А), концентрация фибриногена (Рис. 7Б), показатели ТЭМ (СТ, MCF, CFT,  $\alpha$ -угол и A10) (Рис. 8) и ТГТ (Lagtime (Рис. 7В), Peak thrombin (Рис. 7Г), ETP (Рис. 7Д) и ttPeak (Рис. 7Е)) (патенты RU 2695075 С1, RU 2701195 С1). Полученные результаты позволили оценить процесс образования локального тромба как на раневой поверхности в экспериментах на животных *in vivo*, так и на контактной поверхности покрытий на основе каппа-каррагинана *in vitro*.

Циркуляционно-вибрационное воздействие на стабилизированную цитратом кровь само по себе оказывает умеренное влияние на её коагуляционные параметры. В их числе – снижение числа тромбоцитов в крови (на 11,0 % – с 201,0 до  $179,0 \times 10^9/\text{л}$  в сравнении с показателями крови, находящейся в стационарных условиях), уменьшение концентрации фибриногена в плазме крови (на 5,2 % – с 3,27 до 3,10 г/л), умеренно выраженная гипокоагуляция при ТЭМ (по СТ, углу  $\alpha$ , параметрам MCF, CFT и A10), что, однако, не повлияло на интенсивность генерации тромбина по основным показателям ТГТ – ETP и Peak Thrombin. Сравнение гемостатических свойств крови после контакта с материалом губок проводилось с аналогичными свойствами крови, не контактировавшей с губкой, но подвергавшейся циркуляционно-вибрационному воздействию.

Полученные результаты показали, что массовая доля каппа-каррагинана в составе покрытий в форме губки при нейтральной рН после контакта с кровью мало влияла на содержание основных субстратов свёртывания крови – числа тромбоцитов и уровня фибриногена. Исключением из этого правила явилось снижение числа тромбоцитов в крови после контакта с губкой, содержащей в массовой доле 2,0 % каппа-каррагинана (63,0 против  $179,0 \times 10^9/\text{л}$  в контроле). Массовая доля каппа-каррагинана в составе образца в форме губки при нейтральной рН после контакта с кровью приводила к гиперкоагуляционному сдвигу при ТЭМ исследовании с сопутствующим усилением генерации тромбина в ТГТ.

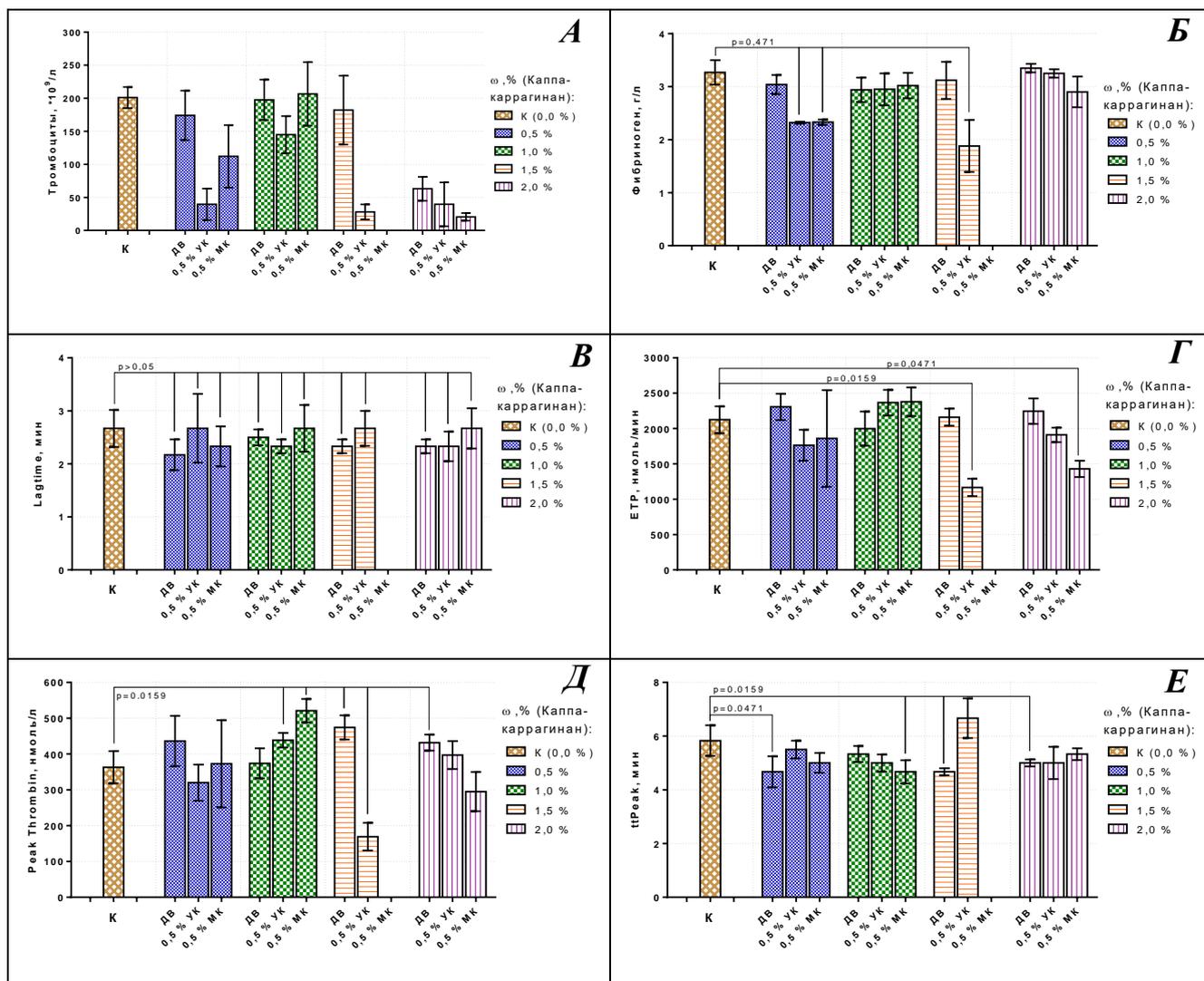
Ситуация значительно изменилась при формировании кислой среды, обусловленной присутствием 0,5 % УК:

1. происходило снижение числа тромбоцитов в крови при концентрации каппа-каррагинана 0,5, 1,5 и 2,0 % соответственно в 4,53, 6,39 и 8,73 раза. В то же время концентрация каппа-каррагинана в составе образца в форме губки, равная 1,0 %, способствовала менее значимому снижению числа тромбоцитов в крови – всего на 19,0 % в сравнении с контролем;

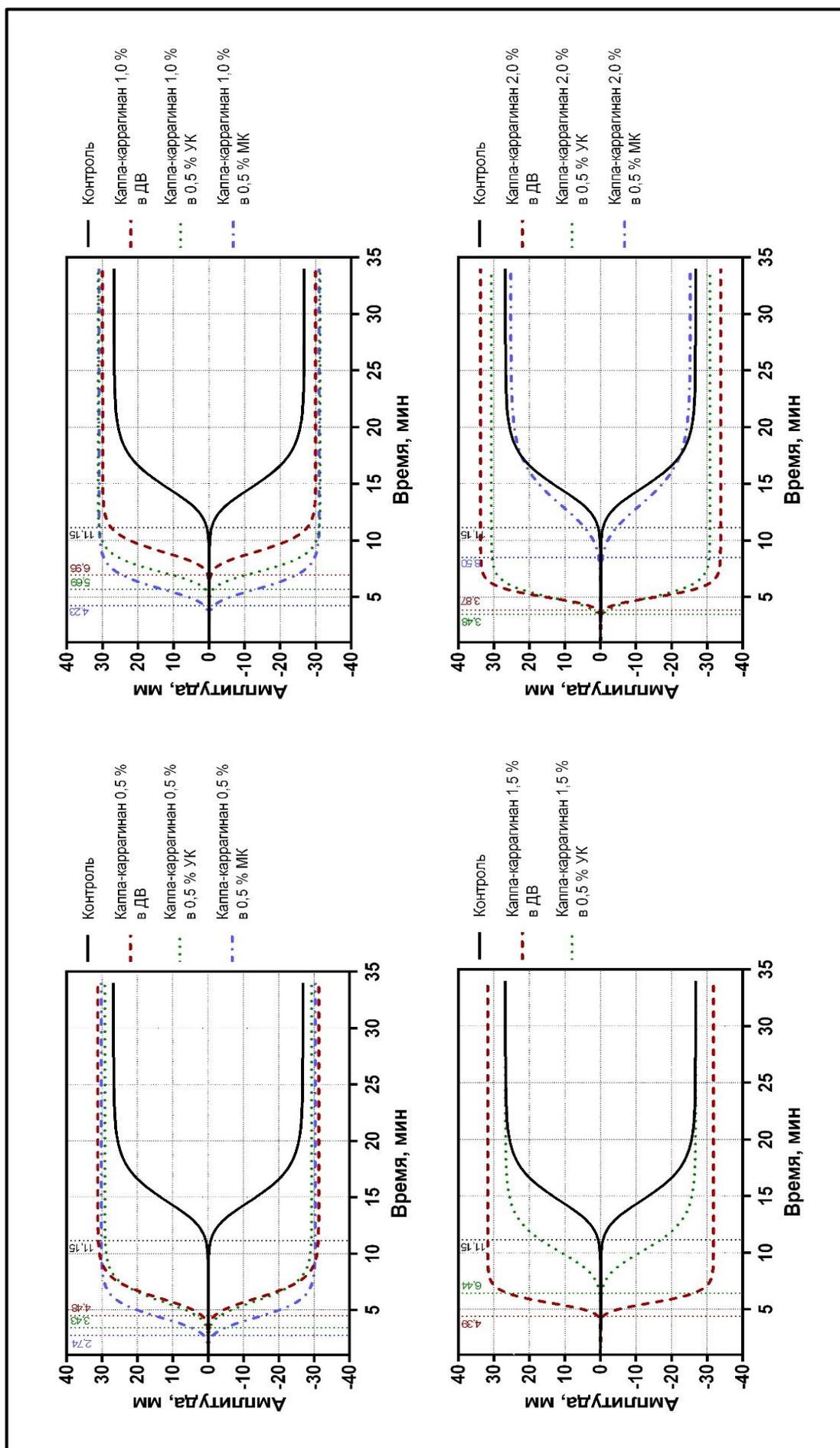
2. наблюдалось снижение концентрации фибриногена в плазме крови при концентрации каппа-каррагинана 0,5 и 1,5 % на 25,2 и 39,4 % соответственно. Концентрации каппа-каррагинана в составе покрытия 1,0 и 2,0 % при контакте с кровью не вызывали снижение уровня данного белка в сравнении с контролем;
3. по данным ТЭМ определялся гиперкоагуляционный сдвиг в крови после контакта с образцами в форме губки во всех используемых концентрациях каппа-каррагинана, причём отмечено, что плотность фибринового сгустка была невысокой и сравнимой с контрольными образцами крови при использовании каппа-каррагинана в концентрации, равной 1,5 % (МСФ составлял 53,5 против 50,0 мм, А10 – 34,0 против 35,0 мм);
4. происходило уменьшение времени начала генерации тромбина и наступления пика генерации тромбина, однако в разной степени кислая среда влияла на интенсивности образования ведущего фермента свёртывания крови. В частности, в плазме крови после контакта с покрытием, тромбинообразование заметно снижалось при концентрациях каппа-каррагинана 0,5 и 1,5 %, в сравнении с контрольными образцами крови (в отличие от последствий её взаимодействия с покрытиями с содержанием каппа-каррагинана 1,0 и 2,0 %) – по значениям эндогенного тромбинового потенциала 110,7 и 1166,6 нмоль/мин соответственно против 1291,5 нмоль/мин в контроле и по показателю пиковой концентрации тромбина 192,8 и 168,9 нмоль/л соответственно против 329,2 нмоль/л в контрольных образцах плазмы крови.

Каппа-каррагинан в составе покрытия в форме губки при кислой рН, обусловленной присутствием 0,5 % МК, усиливал её гемокоагуляционные свойства, однако увеличение массовой доли каппа-каррагинана до 1,5 % приводило к практически полному лишению гемостатического потенциала оттекающей от губки крови по всем исследованным параметрам.

Данные изменения свидетельствовали (при массовой доле каппа-каррагинана 1,5 %) об эффективном потреблении тромбоцитов и фибриногена на гемостатические процессы в поле контакта с покрытием при сохранении гемокоагуляционных свойств крови вне этого поля. Полученные в ходе этих исследований данные *in vitro* вполне соответствовали результатам определения гемостатической активности каппа-каррагинана *in vivo*, где композиция из каррагинана в массовой доле 1,5 % в присутствии 0,5 % УК обладала наибольшей гемостатической активностью.



**Рисунок 7.** Результаты исследований *in vitro*: **А** — влияние массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей на число тромбоцитов; **Б** — влияние массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей на концентрацию фибриногена; влияние массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей на параметры ТГТ (**В** — время запаздывания (Lagtime, мин), **Г** — эндогенный тромбиновый потенциал (ЕТР, нмоль/мин), **Д** — пиковую концентрацию тромбина (Peak Thrombin, нмоль/л), **Е** — время достижения пиковой концентрации тромбина (tPeak, мин)) при взаимодействии покрытий с кровью.



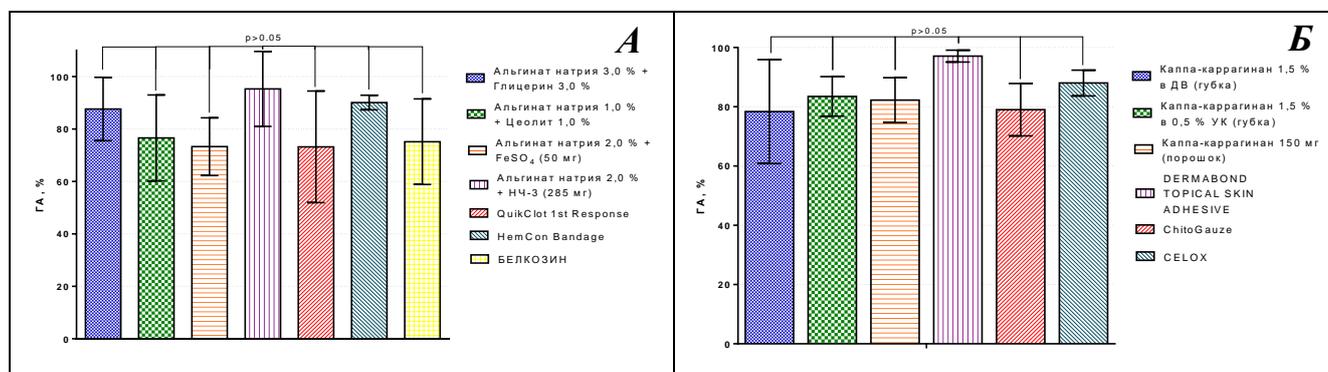
**Рисунок 8.** Схематическое изображение изменений параметров ТЭМ при исследовании покрытий на основе растворов с различной концентрацией капша-каррагинана с использованием ДВ, 0,5 % УК и 0,5 % МК.

### Сравнительная оценка ГА композиций на основе альгината натрия и каппа-каррагинана с гемостатическими средствами из аптечной сети

По итогам анализа полученных результатов исследования установлено, что высокие показатели ГА демонстрируют созданные в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России образцы:

1. покрытие в форме губки на основе 3,0 % альгината натрия с добавлением 3,0 % глицерина (ГА =  $87,61 \pm 12,07$  %);
2. композиция из 1,0 % альгината натрия и 1,0 % цеолита (ГА =  $76,60 \pm 16,41$  %);
3. аппликация на основе 2,0 % альгината натрия с добавлением сульфата железа II в количестве 50 мг (ГА =  $73,29 \pm 11,00$  %);
4. комбинация 2,0 % альгината натрия с 285 мг НЧ-3 с фазовым составом  $\varepsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $\omega = 28,0$  %) +  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $\omega = 18,7$  %) + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ( $\omega = 53,3$  %) (ГА =  $95,29 \pm 14,30$  %);
5. покрытие в форме губки на основе 1,5 % каппа-каррагинана с использованием в качестве растворителя ДВ (ГА= $78,38 \pm 17,52$  %);
6. композиция в форме губки из 1,5 % каппа-каррагинана с использованием в качестве растворителя 0,5 % УК (ГА= $83,50 \pm 6,68$  %);
7. аппликация в форме порошка каппа-каррагинана в количестве 150 г (ГА= $82,26 \pm 7,56$  %).

Проведённый сравнительный анализ локальных гемостатических образцов в форме губки на основе альгината натрия (Рис. 9А) и каппа-каррагинана (Рис. 9Б) с гемостатическими препаратами из аптечной сети (QuikClot 1<sup>st</sup> Response, HemCon Bandage, БЕЛКОЗИН, DERMABOND TOPICAL SKIN ADHESIVE, ChitoGauze и CELOX) показал, что ГА всех сравниваемых образцов имела высокие показатели (от 73,00 % и выше). Следовательно, можно заключить, что разрабатываемые локальные гемостатические покрытия в форме губки на основе альгината натрия и каппа-каррагинана могут составить серьёзную конкуренцию как на международном, так и на российском рынке фармацевтических препаратов и медицинских изделий.



**Рисунок 9.** Сравнительная оценка ГА покрытий на основе **А** — альгината натрия и **Б** — каппа-каррагинана с ГА российских и зарубежных средств, представленных в аптечной сети.

## ВЫВОДЫ

1. Созданы образцы в форме губки на основе 3,0, 4,0 и 5,0 % растворов альгината натрия, обладающие высокой гемостатической активностью от  $73,50 \pm 7,86$  до  $80,20 \pm 14,18$  %, и каппа-каррагинана в формах порошка и губки с гемостатической активностью  $81,81 \pm 7,08$  и  $83,50 \pm 6,68$  % соответственно.
2. Сочетание введения в технологический процесс пластификатора глицерина и нового производственного звена приводит к значительному улучшению структуры покрытия в форме губки на основе раствора альгината натрия, не изменяя его гемостатической активности.
3. Высокой гемостатической активностью обладают аппликационные материалы на основе альгината натрия и каппа-каррагинана в форме губки при сочетании высокой плотности (до  $0,0554 \pm 0,0021$  г/см<sup>3</sup>), длительного времени смачивания (до  $5199 \pm 1498$  с) и низкой поглотительной способности (до  $1295 \pm 127$  %).
4. Добавление в структуру губки на основе растворов альгината натрия дополнительных соединений (солей и оксидов железа в форме наночастиц состава:  $\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ( $\omega=28,0$  %) +  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ( $\omega=18,7$  %) +  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\omega=53,3$  %)) приводит к усилению её гемостатической активности в среднем на 29 %.
5. Сопоставление измерений гемостатических реакций *in vivo* и *in vitro* установило, что все аппликационные материалы, обладающие высокой гемостатической активностью *in vivo*, способствуют гиперкоагуляционному сдвигу показателей параметров системы гемостаза при исследованиях *in vitro*.
6. Разработанные новые покрытия в форме губки на основе растворов альгината натрия: с добавлением глицерина, композиция из альгината натрия и цеолита, аппликация на основе альгината натрия с добавлением сульфата железа II, комбинация альгината натрия с наночастицами оксидов железа и монокомпонента каппа-каррагинана в форме порошка и губки имеют высокую гемостатическую активность (от 73 до 96 %).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

После проведения дальнейших экспертиз (токсикологической и клинической) запатентованные покрытия на основе природных полимеров – альгината натрия и каппа-каррагинана – в композиции с пластифицирующими и активными веществами могут быть использованы в качестве локальных гемостатических средств для осуществления быстрой доврачебной и самопомощи, применения их в экстренных и плановых хирургических вмешательствах, при бытовом использовании, травматизме, ранениях в условиях боевых действий, последствиях терактов и в медицине катастроф.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

**ГА** — гемостатическая активность; **ДВ** — дистиллированная вода (**DW**); **ДМСО** — диметилсульфоксид; **К** — контроль; **МК** — молочная кислота; **МТ** — марлевый тампон; **НЧ** — наночастицы; **ОМ** — оптическая микроскопия; **ПЭГ** — полиэтиленгликоль; **СЭМ** — сканирующая электронная микроскопия; **ТГТ** — тест генерации тромбина; **ТЭМ** — тромбоэластометрия; **УК** — уксусная кислота; **ФР** — физиологический раствор (**PS**).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бычичко, Д. Ю. Создание новых гемостатических покрытий локального действия на основе каппа-каррагинана / Д. Ю. Бычичко, О. Е. Неведрова, М. В. Пыхтеева [и др.] // Клиническая физиология кровообращения. – 2018. – Т. 15. – № 4. – С. 292–299.
2. Бычичко, Д. Ю. Создание новых гемостатических покрытий локального действия на основе альгината натрия / Г. Г. Белозерская, Д. Ю. Бычичко, В. А. Кабак [и др.] // Клиническая физиология кровообращения. – 2018. – Т. 15. – № 3. – С. 222–229.
3. Бычичко, Д. Ю. Сравнительная оценка гемостатических свойств локальных покрытий на основе каппа-каррагинана *in vitro* / Г. Г. Белозерская, А. П. Момот, М. В. Пыхтеева [и др.] // Клиническая физиология кровообращения. – 2019. – Т. 16. – № 2. – С. 148–157.
4. Бычичко, Д. Ю. Новые возможности комплексной оценки гемостатических свойств локальных покрытий *in vivo* и *in vitro* / В. А. Кабак, Г. Г. Белозерская, А. П. Момот [и др.] // Клиническая физиология кровообращения. – 2020. – Т. 17. – № 2. – С. 121–129.
5. Бычичко, Д. Ю. Создание и комплексное исследование новых композиционных гемостатических покрытий / Г. Г. Белозерская, Т. И. Широкова, А. П. Момот [и др.] // Гематология и трансфузиология. Материалы V Конгресса гематологов России. – Москва. – 2020. – Т. 65. – № П1. – С. 121.
6. Бычичко, Д. Ю. Сравнительная оценка гемостатической эффективности новых композиций на основе каппа-каррагинана «*in vivo*» и «*in vitro*» / Д. Ю. Бычичко, О. Е. Неведрова, М. С. Миронов [и др.] // Сборник материалов Российского форума по тромбозу и гемостазу совместно с 10-ой Всероссийской (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии. – Москва. – 2020. – С. 28.
7. Бычичко, Д. Ю. Разработка новых гемостатических композиций для локальной остановки кровотечений / Д. Ю. Бычичко, А. Р. Лемперт, В. А. Кабак [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – Ярославль. – 2018. – Т. 81. – № S. – С. 39.

8. Бычичко, Д. Ю. Тест-система для проведения исследований гемостатических свойств локальных раневых покрытий *in vitro* / Г. Г. Белозерская, В. А. Кабак, Е. М. Голубев [и др.] // патент RU 2695075 С1. – 2019. – Бюл. № 20.
9. Бычичко, Д. Ю. Способ получения искусственных губок в микропробирках для проведения лабораторных исследований *in vitro* / Г. Г. Белозерская, В. А. Кабак, Е. М. Голубев [и др.] // патент RU 2701195 С1. – 2019. – Бюл. № 27.
10. Бычичко, Д. Ю. Гемостатический раствор на основе сульфатированных полисахаридов и получение гемостатических губок из этого раствора (варианты) / Г. Г. Белозерская, В. А. Кабак, В. А. Макаров [и др.] // патент RU 2652270 С1. – 2018. – Бюл. № 12.
11. Бычичко, Д. Ю. Гемостатическая губка (варианты) / Г. Г. Белозерская, В. А. Макаров, У. Л. Джулакян [и др.] // патент RU 2627855 С1. – 2017. – Бюл. № 23.
12. Бычичко, Д. Ю. Гемостатическое покрытие в форме губки или плёнки (варианты) / Г. Г. Белозерская, В. А. Макаров, У. Л. Джулакян [и др.] // патент RU 2639379 С1. – 2017. – Бюл. № 36.