

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, имеющих 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 ρ_c , г/см³ — плотность этилового спирта (0,811 г/см³), 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 (ρ , г/см³) 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, σ — 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 $59,27 \pm 21,59$ %.

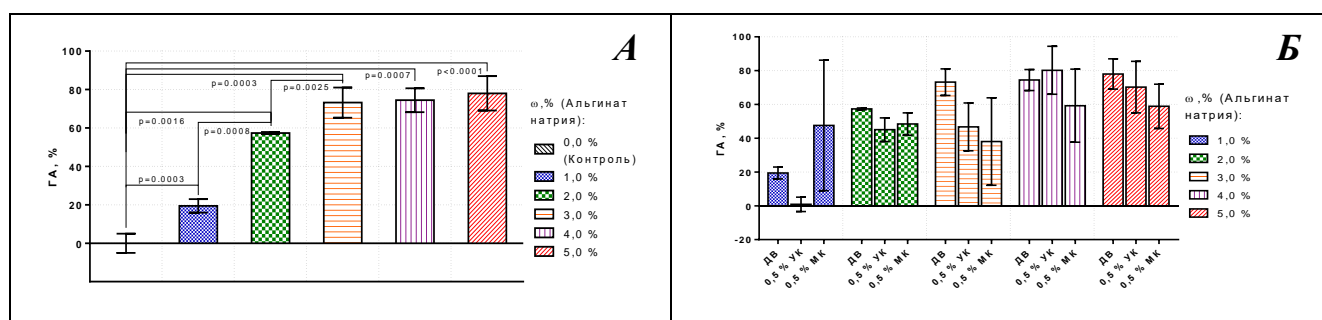


Рисунок 1. **А** — Зависимость ГА от массовой доли (ω , %) альгината натрия в форме губки при применении в качестве растворителя ДВ. **Б** — Зависимость ГА в эксперименте *in vivo* от концентрации альгината натрия в образце и различных растворителей.

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.

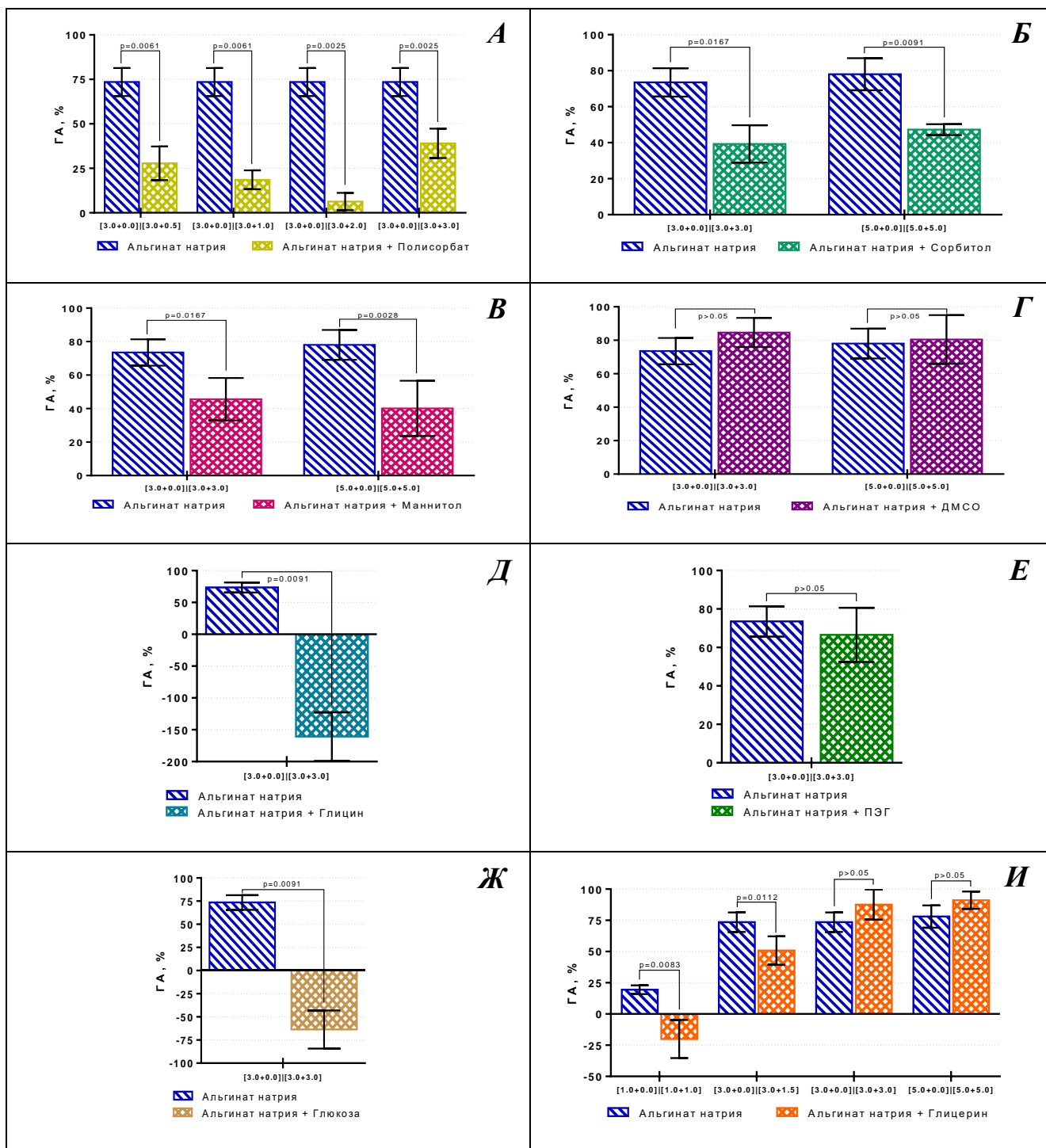


Рисунок 2. Сравнение ГА покрытий в форме губки, созданных из раствора чистого альгината натрия, и покрытий в форме губки, созданных из раствора альгината натрия с добавлением *А* — полисорбата, *Б* — сорбитола, *В* — маннитола, *Г* — ДМСО, *Д* — глицина, *Е* — ПЭГ, *Ж* — глюкоза, *И* — глицерина.

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 ± 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 ± 103 до 1923 ± 532 %. Максимальными значениями водопоглотительной способности в ФР обладали покрытия в форме губки на основе 1,0 % раствора альгината натрия в ДВ (3883 ± 954 %) и 0,5 % МК (3675 ± 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/см³), а наименьшую — на основе 1,0 % растворов (от $0,0132 \pm 0,0016$ до $0,0156 \pm 0,0045$ г/см³).

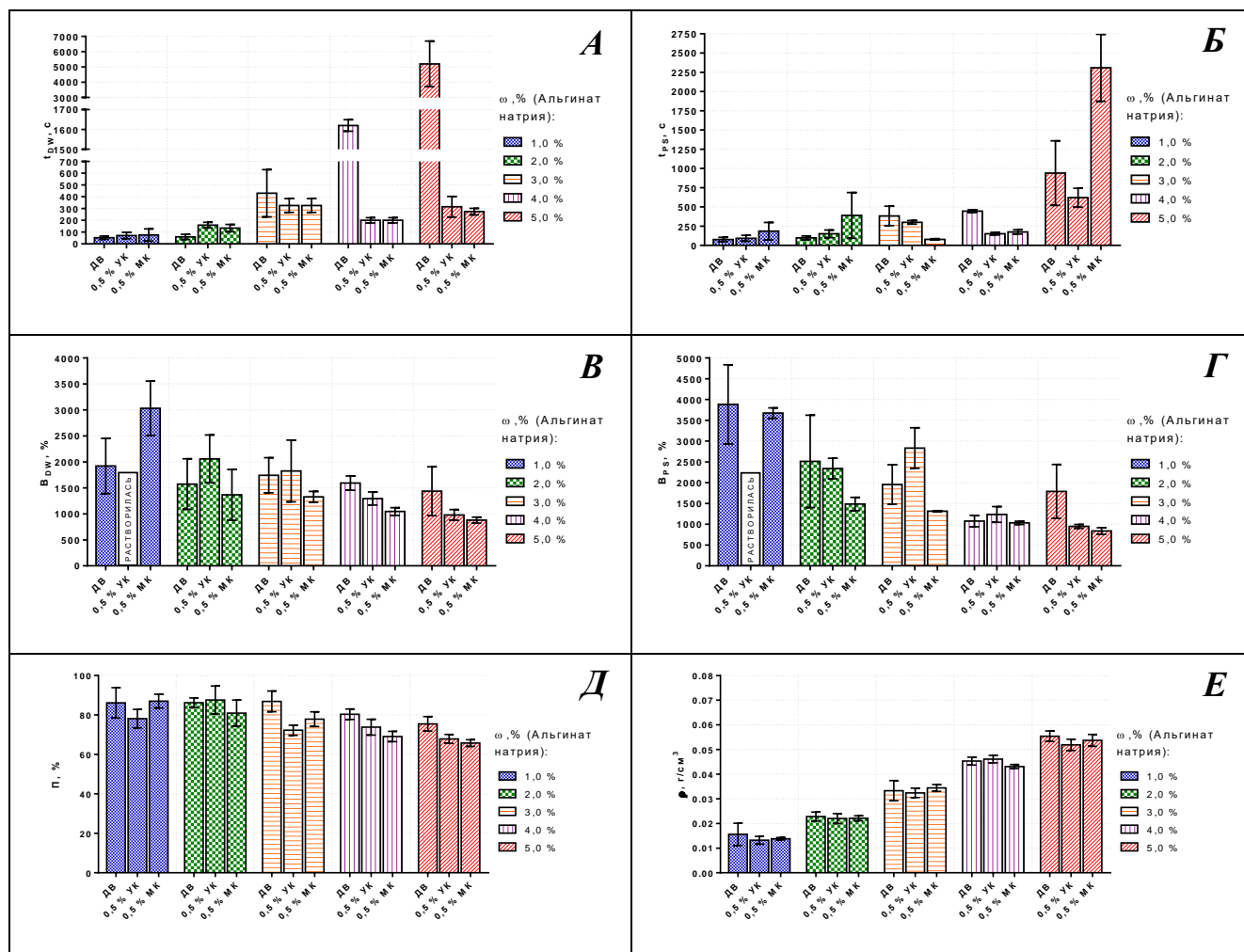


Рисунок 3. Зависимость *A* — времени смачивания образцов в форме губки в ДВ (t_{DW} , с), *B* — времени смачивания образцов в форме губки в ФР (t_{PS} , с), *B* — водопоглощения образцов в форме губки в ДВ (B_{DW} , %), *Г* — водопоглощения образцов в форме губки в ФР (B_{PS} , %), *Д* — пористости (Π , %), *Е* — плотности (ρ , г/см³) образцов в форме губки от концентрации альгината натрия в образце (ω , %) 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 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.

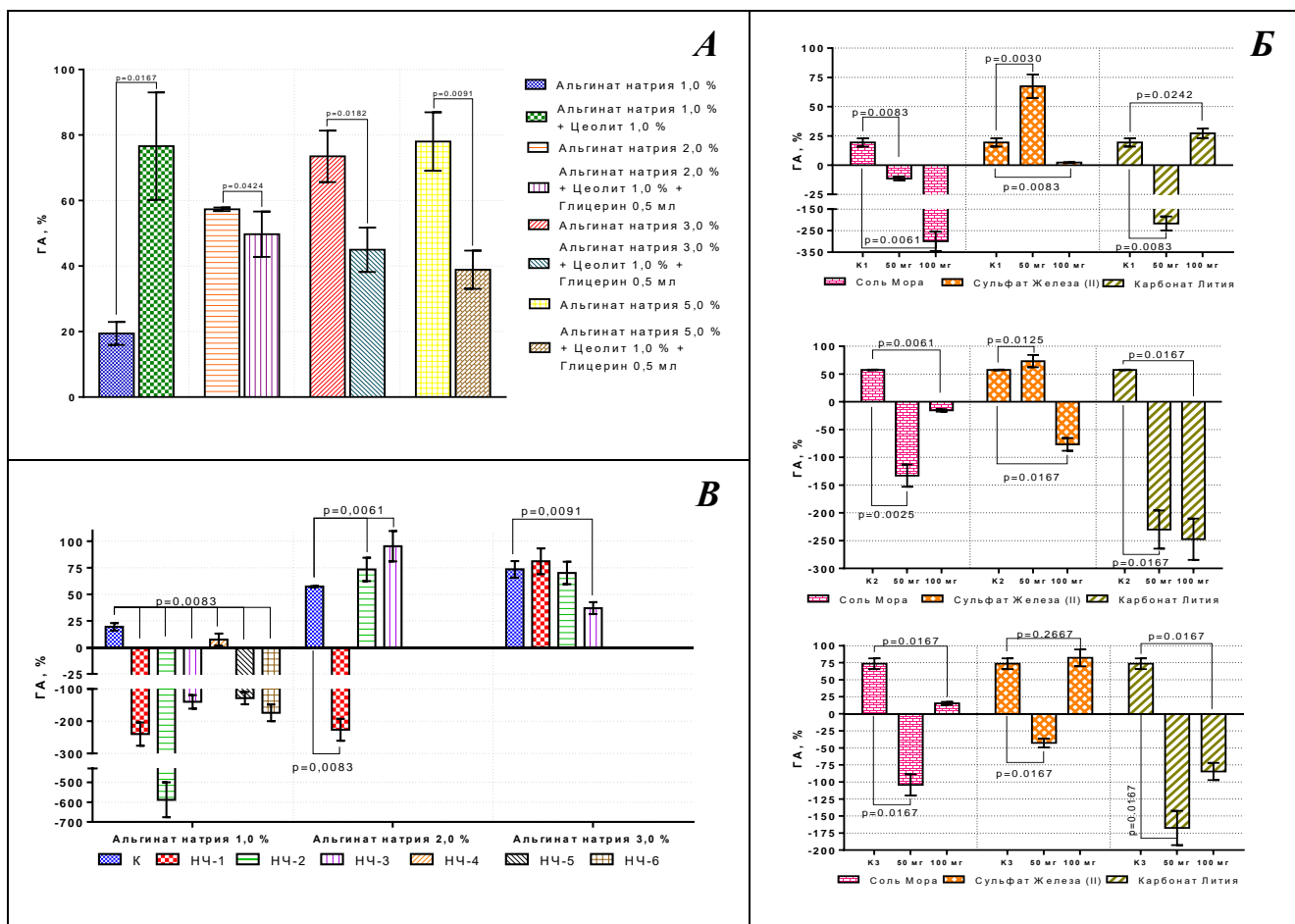


Рисунок 4. *А* — исследование влияния цеолита на ГА образцов в форме губки на основе водных растворов альгината натрия, *Б* — исследование влияния солей металлов на ГА образцов в форме губки на основе водных растворов альгината натрия, *В* — зависимость значений ГА от состава и количества НЧ оксидов 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	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\omega = 33,0 \%$) + $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\omega = 35,0 \%$) + Fe_3O_4 ($\omega = 32,0 \%$)
НЧ-2	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\omega = 74,5 \%$) + $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\omega = 13,5 \%$) + Fe_3O_4 ($\omega = 12,0 \%$)
НЧ-3	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\omega = 28,0 \%$) + $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\omega = 18,7 \%$) + Fe_3O_4 ($\omega = 53,3 \%$)
НЧ-4	ZnO ($\omega = 100,0 \%$)
НЧ-5	$\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($\omega = 40,0 \%$) + $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($\omega = 40,0 \%$) + Al ($\omega = 10,0 \%$) + MgAl_2O_4 ($\omega = 10,0 \%$)
НЧ-6	CuO ($\omega = 80,0 \%$) + 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.

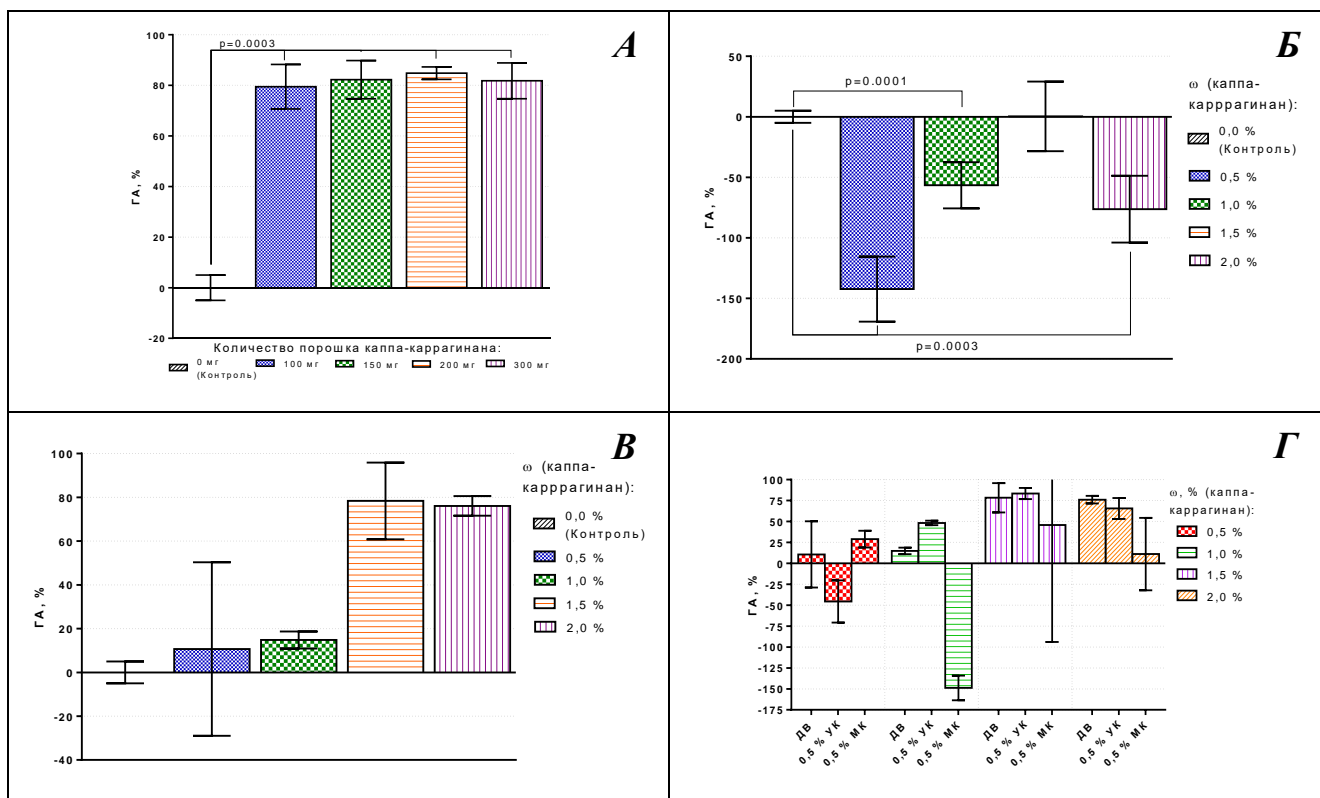


Рисунок 5. *А* — сравнительное исследование ГА различных доз порошка каппа-каррагинана, *Б* — зависимость ГА от концентрации каппа-каррагинана в формах раствора и геля, *В* — зависимость ГА от массовой доли каппа-каррагинана в образцах форме губки при применении в качестве растворителя ДВ, *Г* — сравнительное 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 ± 36 до 1062 ± 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 ± 37 до 888 ± 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 ± 843 до 7159 ± 620 %), а минимальной — на основе 2,0 % (от 2235 ± 186 до 2983 ± 421 %). Высокими значениями водопоглотительной

способностью в ФР обладало покрытие на основе 0,5 % каппа-каррагинана с применением 0,5 % УК в качестве растворителя (9404±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±0,0016 до 0,0518±0,0040 г/см³, при использовании 0,5 % УК: от 0,0115±0,0011 до 0,0399±0,0056 г/см³ 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.

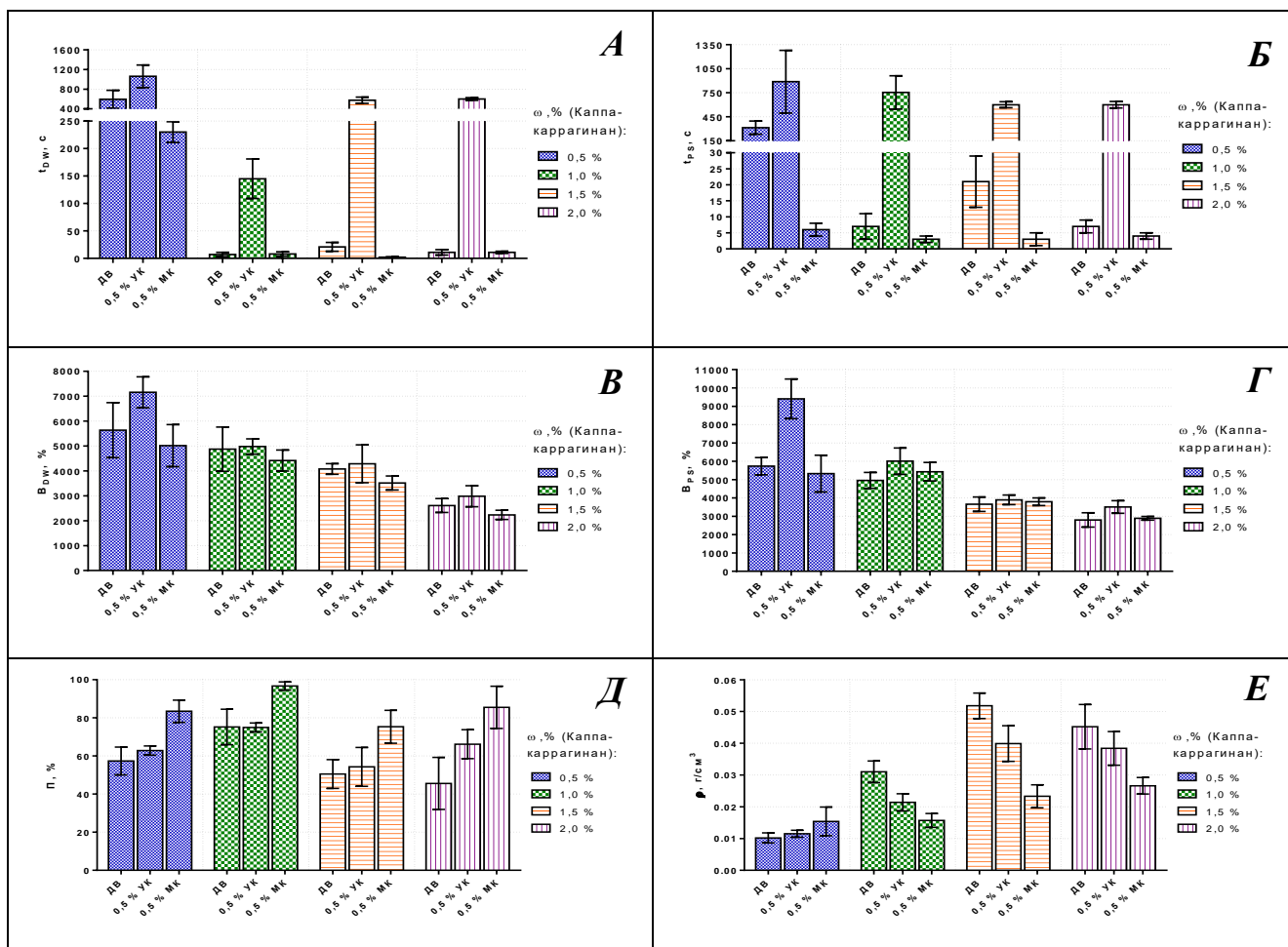


Рисунок 6. Зависимость *A* — времени смачивания образцов в форме губки в ДВ (t_{DW} , с), *Б* — времени смачивания образцов в форме губки в ФР (t_{PS} , с), *В* — водопоглощения образцов в форме губки в ДВ (V_{DW} , %), *Г* — водопоглощения образцов в форме губки в ФР (V_{PS} , %), *Д* — пористости (Π , %), *Е* — плотности (ρ , г/см³) образцов в форме губки от концентрации каппа-каррагинана в образце (ω , %) 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, α -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 $\times 10^9$ /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 α , 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 $\times 10^9$ /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.

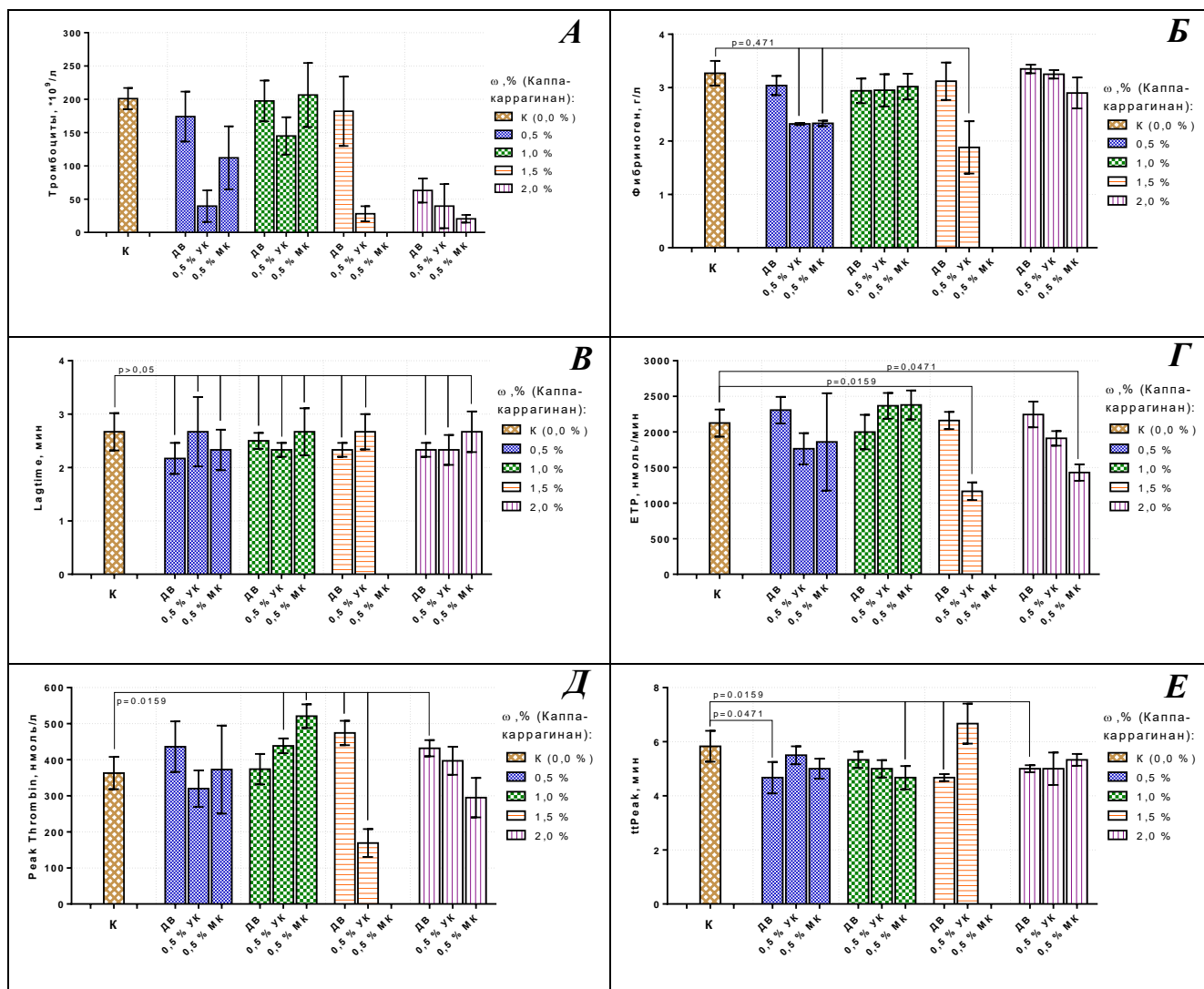


Рисунок 7. Результаты исследований *in vitro*: **А** — влияние массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей на число тромбоцитов; **Б** — влияние массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей на концентрацию фибриногена; влияние массовой доли каппа-каррагинана и различных растворителей 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.

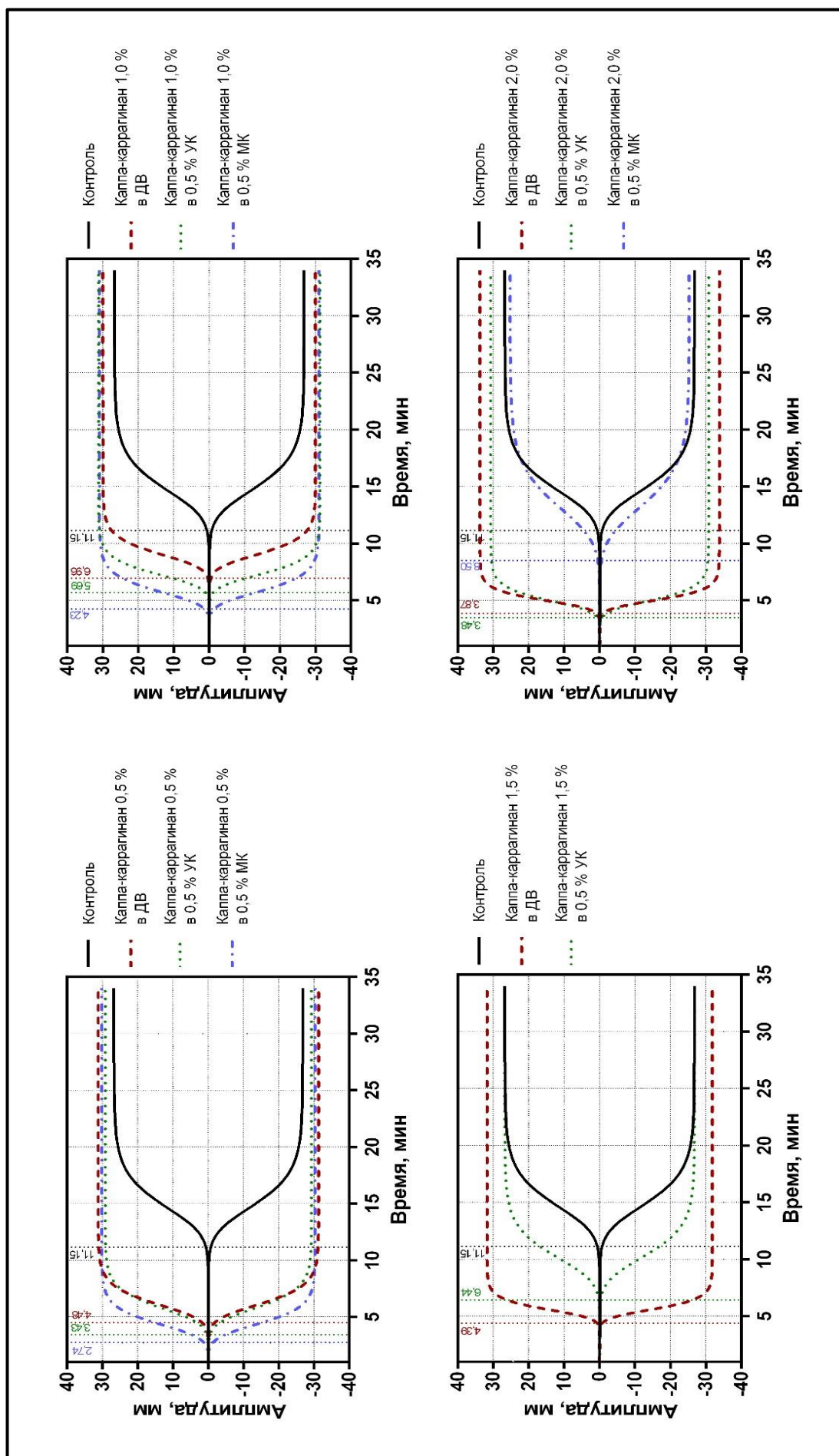


Рисунок 8. Схематическое изображение изменений параметров ТЭМ при исследовании покрытий на основе растворов с различной концентрацией капша-каррагинана с использованием ДВ, 0,5% УК и 0,5% МК.

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 ε -Fe₂O₃ ($\omega = 28,0$ %) + α -Fe₂O₃ ($\omega = 18,7$ %) + Fe₃O₄ ($\omega = 53,3$ %) (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 1st 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.

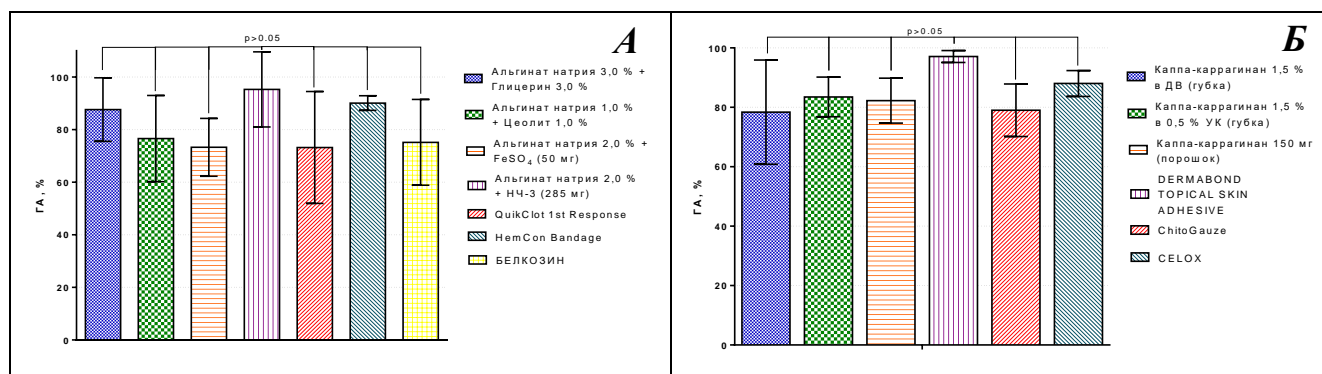


Рисунок 9. Сравнительная оценка ГА покрытий на основе **А** — альгината натрия и **Б** — каппа-каррагинана с ГА российских и зарубежных средств, представленных в аптечной сети.

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/см³), длительного времени смачивания (до 5199 ± 1498 с) и низкой поглотительной способности (до 1295 ± 127 %).
4. Добавление в структуру губки на основе растворов альгината натрия дополнительных соединений (солей и оксидов железа в форме наночастиц состава: ϵ -Fe₂O₃ ($\omega=28,0$ %) + α -Fe₂O₃ ($\omega=18,7$ %) + Fe₃O₄ ($\omega=53,3$ %)) 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.