



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.11.1.004>



Бордаков П.В.¹, Чехольский А.С.², Бордаков В.Н.³

¹ Медицинский центр «Лазарь», Барановичи, Беларусь

² Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских технологий, Минск, Беларусь

Применение турбидиметрического метода в тестировании жидких лекарственных средств местного гемостатического действия

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: все авторы внесли равный вклад в создание статьи.

Подана: 21.06.2024

Принята: 12.12.2024

Контакты: aspirantus@tut.by

Резюме

В статье приведены результаты исследования применения турбидиметрического метода при взаимодействии плазмы крови человека и раствора альбумина с гемостатическими жидкостями на основе хлористых солей железа и алюминия при определении времени необратимой коагуляции (денатурации) белков плазмы. В качестве базового теста использована методика определения тромбинового времени (ТВ), в качестве объектов исследований рассматриваются гемостатические средства аюфер, капрофер и 25% раствор гексагидрата хлорида алюминия, а контрольными реагентами выступают плазма контрольная нормальная и 5% раствор альбумина крови человека. Анализ проведен в 3 сериях по 10 измерений времени денатурации белков контрольной плазмы и 10 – раствора альбумина. Каждая серия соответствовала отдельному лекарственному средству.

Результаты измерений статистически обработаны и подтверждают достоверность количественного определения времени денатурации белков плазмы крови в условиях применения традиционного метода определения ТВ для оценки взаимодействия белковых молекул с растворами лекарственных средств локального гемостаза. Турбидиметрическая методика позволяет быстро и достоверно количественно зафиксировать процесс свертывания белков плазмы крови для гемостатических средств на основе неорганических солей и может быть использована в исследованиях *in vitro* и на доклиническом этапе разработки новых кровоостанавливающих средств и медицинских изделий.

Ключевые слова: локальный гемостаз, процесс денатурации белков, турбидиметрический метод, хлориды металлов

Bordakov P.¹, Cheholsky A.², Bordakov V.³

¹ Medical Center "Lazar", Baranovichi, Belarus

² The Institute of Bioorganic Chemistry of The National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus

³ Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnology,
Minsk, Belarus

Application of the Turbidimetric Method in Testing Liquid Medicines with Local Hemostatic Action

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: all authors contributed equally to the article.

Submitted: 21.06.2024

Accepted: 12.12.2024

Contacts: aspirantus@tut.by

Abstract

The article presents the results of a study of the use of the turbidimetric method in the interaction of human blood plasma and albumin solution with hemostatic fluids based on iron and aluminum chloride salts in determining the time of irreversible coagulation (denaturation) of plasma proteins. The method of determining thrombin time (TV) was used as the basic one, but the hemostatic agents alufer and kaprofer and a 25% solution of aluminum chloride hexahydrate are considered as objects of research, and the control reagents are normal control plasma and a 5% solution of human blood albumin.

The analysis was carried out in three series of 10 measurements of the denaturation time of control plasma proteins and 10 measurements for albumin solution. Each batch corresponded to a separate drug.

The measurement results have been statistically processed and confirm the reliability of the quantitative determination of the denaturation time of plasma proteins under the conditions of using the traditional method of determining TT to assess the interaction of protein molecules with solutions of medicinal local hemostasis.

The turbidimetric technique makes it possible to quickly and reliably quantify the coagulation of plasma proteins for hemostatic agents based on inorganic salts and can be used in in vitro studies and at the preclinical stage of the development of new hemostatic agents and medical devices.

Keywords: local hemostasis, protein denaturation process, turbidimetric method, metal chlorides

■ ВВЕДЕНИЕ

Исследования новых лекарственных средств и медицинских изделий для остановки кровотечений в хирургической практике, при ликвидации последствий катастроф и террористических актов, а также в условиях боевых действий продолжают быть актуальными. Это обусловлено тем, что кровотечение является основной причиной смерти среди раненных в боевых действиях и среди гражданского населения



и имеет значительные клинические и экономические последствия. Оптимальные местные кровоостанавливающие средства еще предстоит разработать для ряда конкретных случаев.

Очевидно, выполнение таких исследований потребует надежных методов количественного тестирования эффективности различных классов локальных гемостатиков *in vitro*, включая жидкие кровоостанавливающие средства. К их числу относятся средства, содержащие неорганические соединения металлов. Довольно часто используемым гемостатическим агентом является раствор Монселя (20% гидроксисульфат железа), который был описан в 1856 г. Л. Монселем (1816–1878), майором-фармацевтом французской армии. Л. Монсель впервые применил раствор как кровоостанавливающее средство во время Крымской войны в 1852 г. [5]. В 1859 г. Уильям Проктер (1801–1884) опубликовал формулу раствора в Американском журнале фармакологии, что привело к более широкому использованию последнего [9]. Проктером был разработан менее кислый раствор Монселя и введен термин «субсульфат железа», который сохранился до сих пор. Сегодня раствор Монселя состоит из 20% водного раствора субсульфата железа, который используется в качестве местного кровоостанавливающего средства при хирургических вмешательствах, а также входит в состав гемостатических губок. В Фармакопею США раствор был включен в 1863 г.

В настоящее время фирмой ULTRADENT (США) выпускается ViscoStat – гемостатический гель на основе сульфата железа. ViscoStat предназначен для остановки поверхностного капиллярного кровотечения. Он рекомендован как гемостатик и ретракционный агент при установке коронок и мостов.

В Республике Беларусь выпускается локальный гемостатик алюфер, представляющий собой водный раствор гексагидратов хлорида железа и хлорида алюминия. Это прозрачная жидкость красно-коричневого цвета с вяжущим кисловатым вкусом и специфическим запахом. При ее взаимодействии с кровью быстро образующийся кровяной сгусток плотно фиксируется на раневой поверхности, что предупреждает повторное кровотечение и препятствует проникновению вторичной инфекции. Применяется для местного гемостаза поверхностных ран, для эндоскопического орошения очагов гастродуоденальных кровотечений и при операциях на паренхиматозных органах [4].

Известен гемостатический препарат капрофер, который был создан в 1980 г. на кафедре стоматологии Ереванского института усовершенствования врачей. Он представляет собой комплекс трехвалентного хлорида железа с ϵ -аминокапроновой кислотой на физиологическом растворе натрия хлорида, находит применение в лечебной эндоскопии [2].

Компанией Septodont (Франция) выпускается раствор Racestypine, который содержит гексагидрат хлорида алюминия в количестве 25%, оксиквинол, гидроалкогольное индифферентное вещество. Применяется в стоматологии при экссудации и десневой геморрагии, ретракции десны путем импрегнации нити. Хлорид алюминия вызывает местный гемостаз за счет преципитации тканевых и сывороточных белков.

В Российской Федерации фирмой «Технодент» производится «Жидкость для остановки капиллярного кровотечения». Показания для применения: инфильтрация крови из десны в пришеечной области зуба, апикальное кровотечение. В состав лекарственного средства входят алюминия хлорид, сульфат оксикинолеина, лидокаин, наполнитель.

В перечисленных жидких кровоостанавливающих средствах действия ионов тяжелых металлов в молекулах белков производят изменения, называемые денатурацией. Наиболее яркое проявление денатурации глобулярных белков – это уменьшение их растворимости и выпадение в осадок. В растворах соли металлов диссоциируют на анион и катион. Катион образует с белками крови и тканей соединения, называемые альбуминаты, что сопровождается изменением структуры белков и их коагуляцией. Термин «альбуминат» в данном случае отражает не только образование комплексов металлов с альбумином, но и денатурацию других белков крови и тканей.

По интенсивности и характеру воздействия на кровь соли различных металлов отличаются, на это одним из первых указал уроженец Российской империи О. Шмидеберг (1838–1921), предложив так называемый ряд Шмидеберга: Pb Bi Al Zn Cu Fe Ag Hg.

Оценка эффективности перечисленных жидких лекарственных средств основана на клиническом применении и в экспериментах на лабораторных животных [6–8].

Однако в описании способа оценки гемостатического эффекта жидких кровоостанавливающих средств предложено определять результат их воздействия на кровь по времени появления сгустка крови при смешивании 1 мл крови с 0,1–0,2 мл лекарственного средства [3]. Отмечено, что гемостатической активностью обладает капрофер при времени образования рыхлого сгустка в 15 секунд, что подтверждается и в клинической практике. Для фиксации времени образования сгустка использовался секундомер при визуальном наблюдении.

Между тем в медицине применяется турбидиметрический метод исследования коагуляционных свойств плазмы крови для определения времени свертывания в ряде тестов [1]. Реализация метода происходит в основном с помощью полуавтоматических анализаторов, производство которых налажено в промышленных масштабах. Наиболее привлекательной для использования в нашем исследовании представляется методика определения тромбинового времени (ТВ) оптическим способом, в ходе которого фиксируется появление волокон фибрина под действием тромбина. Например, для гемокоагулометра CGL2110 (Республика Беларусь) ТВ определяется при смешивании 200 мкл раствора тромбина с 100 мкл плазмы крови человека.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение времени денатурации белков плазмы при взаимодействии плазмы крови человека и раствора альбумина с гемостатическими жидкостями на основе хлористых солей железа и алюминия с применением турбидиметрического метода.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестировались 3 препарата: раствор алюфер, предназначенный для применения в качестве местного гемостатического средства, гемостатический препарат капрофер и раствор хлорида алюминия.

Алюфер – раствор для местного применения производства ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Республика Беларусь), гемостатическое средство капрофер – раствор для наружного применения производства ОАО «Ликвор» (Республика Армения). Раствор хлорида алюминия изготовлен на основе гексагидрата хлорида алюминия фармакопейного



качества производства Merck KGaA (Германия) с концентрацией 25%, аналогичной концентрациям раствора Racestypine и «Жидкость для остановки капиллярного кровотечения» производства «Технодент» (Российская Федерация).

В качестве материалов применялись: плазма контрольная нормальная Helena™ и альбумин, раствор для инфузий 5% производства ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Республика Беларусь). Исследование проводилось на гемокоагулометре турбидиметрическом одноканальном – модель CGL2110 (Республика Беларусь).

В проведенном исследовании за основу взята методика определения ТВ оптическим способом, но при этом объектом исследования является гемостатическая жидкость, а контрольная нормальная плазма и раствор альбумина использовались как денатурируемые белковые реагенты.

В соответствии с методикой измерения ТВ для определения времени денатурации белков плазмы крови в пластиковую кювету вносили 0,1 мл исследуемой плазмы. Плазму инкубировали в течение 2 минут при температуре 37 °С. Далее к плазме добавляли 0,2 мл раствора локального гемостатического средства, которое имело комнатную температуру, и фиксировали время образования сгустка белков плазмы.

Время денатурации альбумина оценивали аналогичным образом, внося в кювету 0,1 мл 5% раствора альбумина, а затем проводили измерения после добавления 0,2 мл аюфера, капрофера или 25% раствора гексагидрата хлорида алюминия соответственно для каждого лекарственного средства.

Проведены 3 серии измерений времени денатурации белков контрольной плазмы – по 10 измерений для аюфера, капрофера и раствора гексагидрата хлорида алюминия. Для этих же гемостатических средств и раствора хлорида алюминия проведены 3 серии по 10 измерений времени денатурации белка 5% раствора альбумина.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментального исследования тестирования жидких гемостатических средств по времени денатурации белков нормальной контрольной плазмы и раствора альбумина турбидиметрическим методом представлены в таблице. Экспериментальные данные были введены в программу IBM SPSS Statistics версия 26. Анализ по критерию Колмогорова – Смирнова позволил представить результаты всех серий как среднее со стандартным отклонением при $p=0,05$ для 2 гемостатических средств и модельного 25% раствора хлорида алюминия.

Для лекарственного средства аюфер время денатурации белков контрольной плазмы составляет $8,64 \pm 0,51034$ с, для раствора альбумина – $8,49 \pm 0,4383$ с. При тестировании капрофера время денатурации белков контрольной плазмы составляет $8,21 \pm 0,15951$ с, для раствора альбумина – $8,37 \pm 0,32335$ с. Модельный раствор 25% раствора гексагидрата хлорида алюминия при тестировании с контрольной плазмой показал время денатурации белков $8,31 \pm 0,37845$ с и для раствора альбумина крови человека $8,19 \pm 0,51737$ с.

Анализ полученных данных лабораторных измерений времени необратимой коагуляции (денатурации) белков плазмы крови человека для 2 контрольных материалов, которыми являются 5% раствор альбумина и лабораторный реагент «плазма контрольная нормальная», показал достоверность использованного турбидиметрического оптического метода. При этом тестируемые препараты: раствор

Контрольные реагенты	N	T min, с	T max, с	T ср., с	S, с
Время денатурации белков плазмы контрольной нормальной и раствора альбумина аюфером					
Раствор 5% альбумина	10	8,20	9,30	8,6400	0,51034
Плазма контрольная	10	8,10	9,30	8,4900	0,43830
Время денатурации белков плазмы контрольной нормальной и раствора альбумина капрофером					
Раствор 5% альбумина	10	8,10	8,90	8,3700	0,32335
Плазма контрольная	10	8,10	8,50	8,2100	0,15951
Время денатурации белков плазмы контрольной нормальной и раствора альбумина раствором хлорида алюминия					
Раствор 5% альбумина	10	7,80	9,60	8,1900	0,51737
Плазма контрольная	10	7,80	9,00	8,3100	0,37845
p=0,05					

Примечания: N – количество исследований; T min, с – минимальное время денатурации белков плазмы; T max, с – максимальное время денатурации белков плазмы; T ср., с – среднее время денатурации белков плазмы; S, с – стандартное отклонение.

гемостатический аюфер, гемостатическое средство капрофер и модельный раствор хлорида алюминия аналогичный «Жидкость для остановки капиллярного кровотечения» – имеют различный химический состав. Аюфер содержит на 1 мл раствора 500 мг гексагидрата хлорида железа и 450 мг гексагидрата хлорида алюминия в качестве активных ингредиентов, остальное – вода очищенная. В капрофере на 1 мл раствора содержится: активные ингредиенты – железа хлорид 6-водное – 947 мг, ε-аминокапроновая кислота – 24 мг, а вспомогательное вещество – раствор натрия хлорида изотонического 0,9% – 448 мг. В составе 25% раствора гексагидрата хлорида алюминия 1 мл препарата содержит 250 мг гексагидрата хлорида алюминия и воду.

Полученные результаты отражают особенности химического состава исследованных локальных гемостатических средств, что косвенно подтверждает различие во взаимодействии белковых молекул плазмы крови с ионами различных металлов, в данном случае ионов железа и алюминия в аюфере, ионов железа в капрофере и ионов алюминия в 25% растворе хлорида алюминия.

■ **ВЫВОДЫ**

Применение турбидиметрической методики позволит значительно сократить продолжительность исследований и материальные затраты при оценке гемостатической эффективности лекарственных средств, в то время как эксперименты на животных длятся в течение нескольких часов и имеют значительную стоимость. Проведение исследований с использованием контрольной плазмы и раствора альбумина более корректно для оценки гемостатического эффекта кровоостанавливающих средств, так как биохимический состав крови человека отличается от биохимического состава крови животных.

Данная методика позволяет достаточно убедительно количественно зафиксировать процесс свертывания белков плазмы крови для гемостатических средств на основе неорганических солей и может быть использована в исследованиях in vitro на доклиническом этапе разработки новых лекарственных средств и медицинских изделий.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Berkovsky A.L., Sergeeva E.V., Prostakova T.M., et al. Screening tests of plasma hemostasis. In: *Research methods*. M., 2016.
2. Korobchenko A.A. (1996) *The use of the hemostatic drug kaprofer in therapeutic endoscopy* (abstract of the dissertation of the candidate of medical sciences), St. Petersburg: Research Institute of Hematology and Transfusiology.
3. A method for evaluating the hemostatic effect of liquid hemostatic agents. Patent of the Russian Federation No. 2286569C1.
4. Chumanevich O.A. (2007) *Medico-biological properties of the local hemostatic agent "Alufer" for gastroduodenal bleeding (experimental clinical study)* (abstract of the dissertation for the degree of candidate of medical sciences), Minsk.
5. Garrett A.P., Wenham R.M., Sheets E.E. Monsel's Solution: A Brief History. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2002 October;6(4):225–227.
6. Nouri S., Sharif M.R. Efficacy and safety of ferric chloride in controlling hepatic bleeding: an animal model study. *Hepatitis Monthly*. 2014;14(6). doi: 10.5812/hepatmon.18652
7. Nouri S., Sharif M.R., Sahba S. The Effect of Ferric Chloride on Superficial Bleeding. *Trauma Monthly*. 2015;20(1).
8. Nouri S., Sharif M.R. Hemostatic effect of aluminum chloride in liver bleeding: an animal model study. *Tehran University Medical Journal*. 2014;72(7):435–42.
9. Proctor W. Remarks on Monzel's iron persulfate. *American Journal of Pharmacology*. 1859;31:403–7.