

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ ГУБЧАТЫХ СРЕДСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ КРОВООСТАНАВЛИВАЮЩИМИ И ПРОТИВОСПАЕЧНЫМИ СВОЙСТВАМИ

HISTOLOGICAL RATIONALE FOR THE USE OF TWO-COMPONENT SPONGE PRODUCTS WITH HEMOSTATIC AND ANTI-ADHEMOUS PROPERTIES

■ Липатов Вячеслав Александрович
Доктор медицинских наук

■ Панов Александр Анатольевич

■ Мишина Екатерина Сергеевна
Кандидат медицинских наук

■ Кудрявцева Татьяна Николаевна
Кандидат химических наук

■ Грехнева Елена Владимировна
Кандидат химических наук

■ Денисов Артём Александрович

■ Ванина Анастасия Сергеевна

■ Корельская Кристина Антоновна

■ Курский государственный медицинский
университет

■ Курский государственный университет

■ Lipatov Vyacheslav Alexandrovich
Doctor of Medical Sciences

■ Panov Alexander Anatolievich

■ Mishina Ekaterina Sergeevna
Candidate of Medical Sciences

■ Kudryavtseva Tatyana Nikolaevna
PhD in Chemistry

■ Grekhneva Elena Vladimirovna
PhD in Chemistry

■ Denisov Artyom Alexandrovich

■ Vanina Anastasia Sergeevna

■ Korelskaya Kristina Antonovna

■ Kursk State Medical University

■ Kursk State University

E-mail: denisovaa@kursksmu.net

Резюме

В настоящее время случаи повреждения паренхиматозных органов по различным причинам остаются распространенным явлением. Наиболее часто повреждение происходит в результате травм и различных оперативных вмешательств. В современной хирургической практике при остановке кровотечений из паренхиматозных органов все чаще используют широкий набор аппликационных гемостатических средств. Наибольшее распространение для этих целей получили гемостатические губки. Преимуществом такого способа остановки кровотечения в том, что губки имеют высокую степень адгезии к раневой поверхности без дополнительных фиксации и травматизации окружающих тканей, а также системного влияния на свертывающую систему крови. Цель исследования: изучение тканей печени после имплантации двухслойных гемостатических губок на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-KMЦ) на основании данных аутопсии.

Материалы и методы. Материалом исследования выступили следующие образцы: двухкомпонентное губчатое гемостатическое средство на основе Na-KMЦ (№1) (экспериментальный образец, разработанный на базе КГМУ), «ТахоКомб» (№2) (Takeda, Австрия), Surgicel Fibrillar (№3) (Johnson&Johnson, США). Кроликам в условиях операционного блока лаборатории экспериментальной хирургии и онкологии НИИ ЭМ ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, под ингаляционным наркозом выполняли срединную лапаротомию, моделировали поверхностное травмирование печени с последующей аппликацией тестируемых образцов гемостатических изделий. На 14 сутки после моделирования животные выводились из эксперимента путем CO₂-индуцированной эвтаназии. После выведения из эксперимента выполнялась аутопсия печени на месте моделирования травмы и проведения гемостаза. Образцы после экспозиции в растворе нейтрального формалина были окрашены гематоксилином и по Ван Гизон. Выполнено морфологическое и морфометрическое исследование.

Результаты. После применения двухкомпонентных МКС на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы выявлено незначительное утолщение собственной капсулы за счет наложения остатков материала, при этом гепатоциты и триады неизменны. В результате применения пластины ТахоКомб выявлено значительное утолщение капсулы при наличии дистрофических изменений в гепатоцитах. После применения гемостатической матрицы Surgicel Fibrillar выявлены очаги некроза в зоне имплантации под участком некроза определяется рубцовые изменения тканей печени с полиморфноклеточной инфильтрацией.

Выводы. Таким образом, в группе № 1 толщина собственной капсулы в 3,4 и 3,5 раза меньше, чем в группах №2 и №3. Это позволяет судить о менее выраженном течении воспалительных и регенеративных процессов, направленных на отграничение зоны травматизации. Данное утверждение подтверждается статистически значимыми отличиями клеточного состава капсулы (в группе №1 преобладают клетки фибробластического ряда, и их число превышает значения группы №2 и №3). Также в группе № 3 определяются очаги некроза, под которыми определяется большое количество рубцовой ткани.

Ключевые слова: спаечный процесс, двухслойная кровоостанавливающая губка, гемостатическая губка, ТахоКомб, Surgicel Fibrillar, Губка гемостатическая коллагеновая, Na-KMЦ.

Currently, cases of damage to parenchymal organs for various reasons remain common. Most often, damage occurs as a result of trauma and various surgical interventions. In modern surgical practice, a wide range of application hemostatic agents are increasingly used to stop bleeding from parenchymal organs. The most widely used for these purposes are hemostatic sponges. The advantage of this method of stopping bleeding is that the sponges have a high degree of adhesion to the wound surface without additional fixation and trauma to surrounding tissues, as well as a systemic effect on the blood coagulation system.

Purpose of the study: to study liver tissue after implantation of two-layer hemostatic sponges based on carboxymethylcellulose sodium salt (Na-CMC) based on autopsy data.

Materials and methods. The research materials were the following samples: two-component sponge hemostatic agent based on Na-CMC (No. 1) (an experimental sample developed on the basis of KSMU), "TachoComb" (No. 2) (Takeda, Austria), Surgicel Fibrillar (No. 3) (Johnson & Johnson, USA). Rabbits were subjected to a median laparotomy under inhalation anesthesia in the laboratory of experimental surgery and oncology at the Scientific Research Institute of Emergency Medicine of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the KSMU of the Ministry of Health of Russia, and a superficial liver injury was simulated, followed by the application of tested samples of hemostatic products. On the 14th day after modeling, the animals were removed from the experiment by CO₂-induced euthanasia. After withdrawal from the experiment, a liver autopsy was performed at the site of injury simulation and hemostasis. After exposure to a neutral formaldehyde solution, samples were stained with hematoxylineosin and Van Gieson staining. A morphological and morphometric study was performed.

Results. After the use of two-component MCS based on the sodium salt of carboxymethylcellulose, a slight thickening of the capsule proper was revealed due to the overlay of material residues, while hepatocytes and triads remained unchanged. As a result of the use of the TachoComb plate, a significant thickening of the capsule was revealed in the presence of dystrophic changes in hepatocytes. After using the hemostatic matrix Surgicel Fibrillar, foci of necrosis were identified in the implantation zone, under the area of necrosis, cicatricial changes in liver tissue with polymorphic cell infiltration were determined.

Conclusions. Thus, in group No. 1 the thickness of the native capsule is 3.4 and 3.5 times less than in groups No. 2 and No. 3. This allows us to judge a less pronounced course of inflammatory and regenerative processes aimed at delimiting the zone of trauma. This statement is confirmed by statistically significant differences in the cellular composition of the capsule (in group No. 1, fibroblastic cells predominate, and their number exceeds the values of groups No. 2 and No. 3). Also in group No. 3, foci of necrosis are identified, under which a large amount of scar tissue is determined.

Key words: adhesive process, two-layer hemostatic sponge, hemostatic sponge, TachoComb, Surgicel Fibrillar, hemostatic collagen sponge, Na-CMC.

Библиографическая ссылка на статью

Липатов В.А., Панов А.А., Мишина Е.С., Кудрявцева Т.Н., Грехнева Е.В., Денисов А.А., Ванина А.С., Корельская К.А.
Гистологическое обоснование применения двухкомпонентных губчатых средств, обладающих кровоостанавливающими и противовоспалительными свойствами // Innova. - 2023. - Т. 9 № 3. - С.47-56.

References to the article

Lipatov V.A., Panov A.A., Mishina E.S., Kudryavtseva T.N., Grekhneva E.V., Denisov A.A., Vanina A.S., Korelskaya K.A.
Histological rationale for the use of two-component sponge agents with hemostatic and anti-inflammatory properties // Innova. - 2023. - T. 9 No. 3. - P.47-56.

Частота травматизации паренхиматозных органов сохраняется на высоком уровне в результате ряда причин. Обычно повреждение вызвано травмой и различными хирургическими вмешательствами. В практике хирурги для остановки кровотечения часто используют хирургические швы и электрокоагуляцию, которые являются дополнительным травмирующим агентом для печени, селезенки, почек и вызывают естественные посттравматические явления кровотечения, а одним из осложнений является образование спаек [1, 2, 3].

Даже если принять во внимание современные хирургические методы лечения травм паренхиматозных органов (применение эндовидеохирургических методов) и использование различных материалов (кровоостанавливающих губок, мембран, покрытий, гелей и т. д.), не всегда удается обеспечить достаточный гемостаз. Результатом является избыточное образование фибрина и образование спаек [3, 4]. Это осложнение чаще возникает при выполнении открытых вмешательств. Этим объясняются травматизация брюшины при оперативном доступе, приеме и выходе из операции [5].

В современной хирургической практике для остановки кровотечений в паренхиматозных органах все чаще применяются локальные кровоостанавливающие средства. Для этой цели чаще всего используют кровоостанавливающие губки [6]. При изготовлении местных гемостатиков в качестве основы используют множество полимерных матриц – коллаген, медицинский желатин, хитозан, окисленные формы целлюлозы. Чтобы повысить эффективность кровоостанавливающих препаратов, производители добавляют в их

состав дополнительные компоненты (транексамовую кислоту, аминокaproновую кислоту и др.), кроме того, продукция подвергается различным химическим и физическим воздействиям, изменяющим ее физические свойства, например уровень pH. [7, 8].

Преимущество применения локальных губчатых средств остановки кровотечения в том, что они, обладая высокой степенью адгезии, прочно прилегают к поверхности раны. Это позволяет использовать их без дополнительной фиксации швами и дополнительной травматизации окружающих тканей [9]. Кроме того, благодаря пористой структуре материала продукт может впитывать массу крови, в несколько раз превышающую исходную массу средства. Еще одной положительной особенностью является биосовместимость таких изделий – период элиминации из организма длится, в среднем 7 дней после имплантации [10, 11].

Исходя из этого, актуальной проблемой абдоминальной хирургии является разработка новых методов изучения эффективности и безопасности гемостатических губчатых образцов, а также их влияния на окружающие ткани.

Цель исследования - сравнительное изучение гистологических препаратов, полученных при аутопсии ткани печени после имплантации гемостатических средств.

Материалы и методы. В качестве сравниваемых материалов использовали: 1 группа – Двухкомпонентное губчатое гемостатическое средство на основе Na-KMЦ; 2 группа – «ТахоКомб» (Takeda, Австрия); 3 группа - Surgicel Fibrillar (Johnson&Johnson, США).

Таблица 1. Распределение образцов на группы исследования

Группа экспериментов	Характеристика средства	Производитель
1 группа (опыт)	Двухкомпонентное губчатое средство на основе Na-КМЦ средней и высокой вязкости	Лаборатория разработки и доклинических испытаний НИИ ЭМ КГМУ и КГУ
2 группа (сравнение)	«ТахоКомб», кровоостанавливающая пористая пластина с нанесенным фибриногеном и тромбином	Takeda, Австрия
3 группа (сравнение)	Surgicel Fibrillar, 7-слойный гемостатический материал на нетканой основе	Johnson&Johnson, США

Состав опытного образца разработан совместно с сотрудниками кафедры биологической и химической технологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России и кафедры химии ФГБОУ ВО КГУ (Курск, Россия).

Двухкомпонентное губчатое гемостатическое средство на основе Na-КМЦ разработано на базе ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России и представляет собой двуслойную губку с длиной стороны 5 см, толщиной 1 см, состоящую из натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы средней (400-800 сР) и высокой (1100-1900 сР) вязкостью. Сторона губки со средней вязкостью имплантируется непосредственно на раневую поверхность, другая сторона обращена наружу, выступая в роли барьера для спайкообразования.

В стерильных условиях операционного блока лаборатории экспериментальной хирургии и онкологии НИИ ЭМ КГМУ Минздрава России выполняли оперативное вмешательство 12 кроликам-самцам породы «Советская шиншилла» (по 3 животных в каждой экспериментальной группе согласно числу видов тестируемых материалов) под контролем регионального этического комитета при ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России. Для обеспечения анестезиологического пособия использовался ингаляционный масочный наркоз: концентрация

изофлюрана во вдыхаемой газовой смеси – 3%, поток воздуха – 1 л/мин. Применяли наркозный аппарат RWD Life Science R340 Isoflurane. Все этапы экспериментального исследования были проведены с соблюдением международных и отечественных норм гуманного обращения с лабораторными животными.

Во время операции животное располагалось лежа на спине, конечности были зафиксированы к операционному столу. После стандартной трехкратной обработки операционного поля выполнялась срединная лапаротомия с последующим выведением печени в операционную рану и отграничение салфетками смоченными физиологическим раствором. Для моделирования раневого процесса использовали трафарет с отверстием квадратной формы размером 1х1 см. Выполняли поверхностное травмирование ткани печени (иссечение), выступающей через отверстие при надавливании на трафарет. После этого, к кровоточащей ране прикладывали исследуемые изделия, соответствующие площади раневого процесса (1х1 см) (Рис.1). При использовании двухкомпонентного гемостатического средства на основе Na-КМЦ, учитывали специфику его применения – изделие прикладывали стороной, изготовленной из полимера с более низкой вязкостью (окрашена фулорцином).



Рисунок 1. Моделирование травмы печени с использованием трафарета; b - аппликация гемостатического материала;

По завершению хронического опыта на 14-е сутки животные были выведены из эксперимента путем CO₂-индуцированной эвтаназии. Был выполнен забор образцов ткани печени из области имплантации изучаемых МКС. Гистологический материал фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине в течение 7 суток. По стандартной методике изготавливали парафиновые блоки и микропрепараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Маллори. Для морфометрической оценки производили фотографирование микропрепаратов с помощью цифрового сканера микропрепаратов Leica ScanScope CS2 для светлого поля на увеличениях $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ [11].

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы «Statistic 13.3 Pro» (Dell Software Company, Round Rock, Texas, United States of America). Учитывая

качественный оценочный характер данных, для определения уровня их статистической значимости использовали критерий Манна-Уитни. При проверке статистической гипотезы, критический уровень значимости (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение.

При морфологическом исследовании тканей печени при использовании образцов двухкомпонентных гемостатических губок на основе NaKMЦ средней и высокой вязкости на поверхности определяется очаговое утолщение собственной капсулы и наложения в виде остатков материала с фибропластическим процессом вокруг. При этом гепатоциты, находящиеся под капсулой визуально не изменены, печеночные балки не нарушены. Сосуды триад печени, а также центральные вены без патоморфологических изменений.

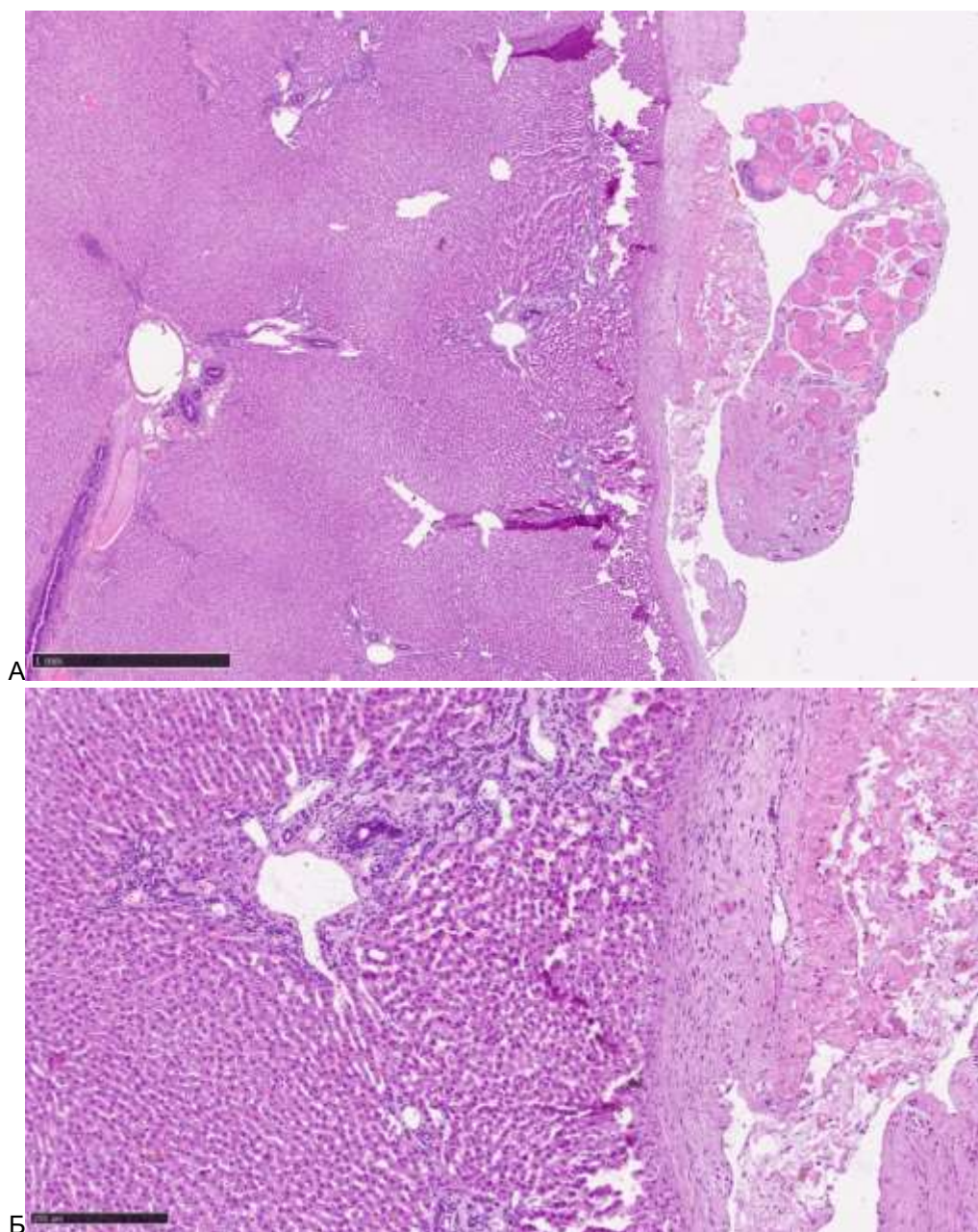


Рисунок 2. Микрофотография участка печени при использовании двуслойной гемостатической губки на основе NaKMЦ. Окр. Г+Э. А- ув.40, Б- ув.200.

При гистологическом исследовании тканей печени при использовании образца Тахокомб определяется очаговое резко выраженное утолщение капсулы печени с выраженной фибропластической реакцией, приводящей к спайкообразованию. Гепатоциты,

находящиеся под капсулой с признаками дистрофии, печеночные балки не нарушены. Единичные сосуды триад печени, а также центральные вены кавернозно расширены. Очагов некроза, склероза не определяется.

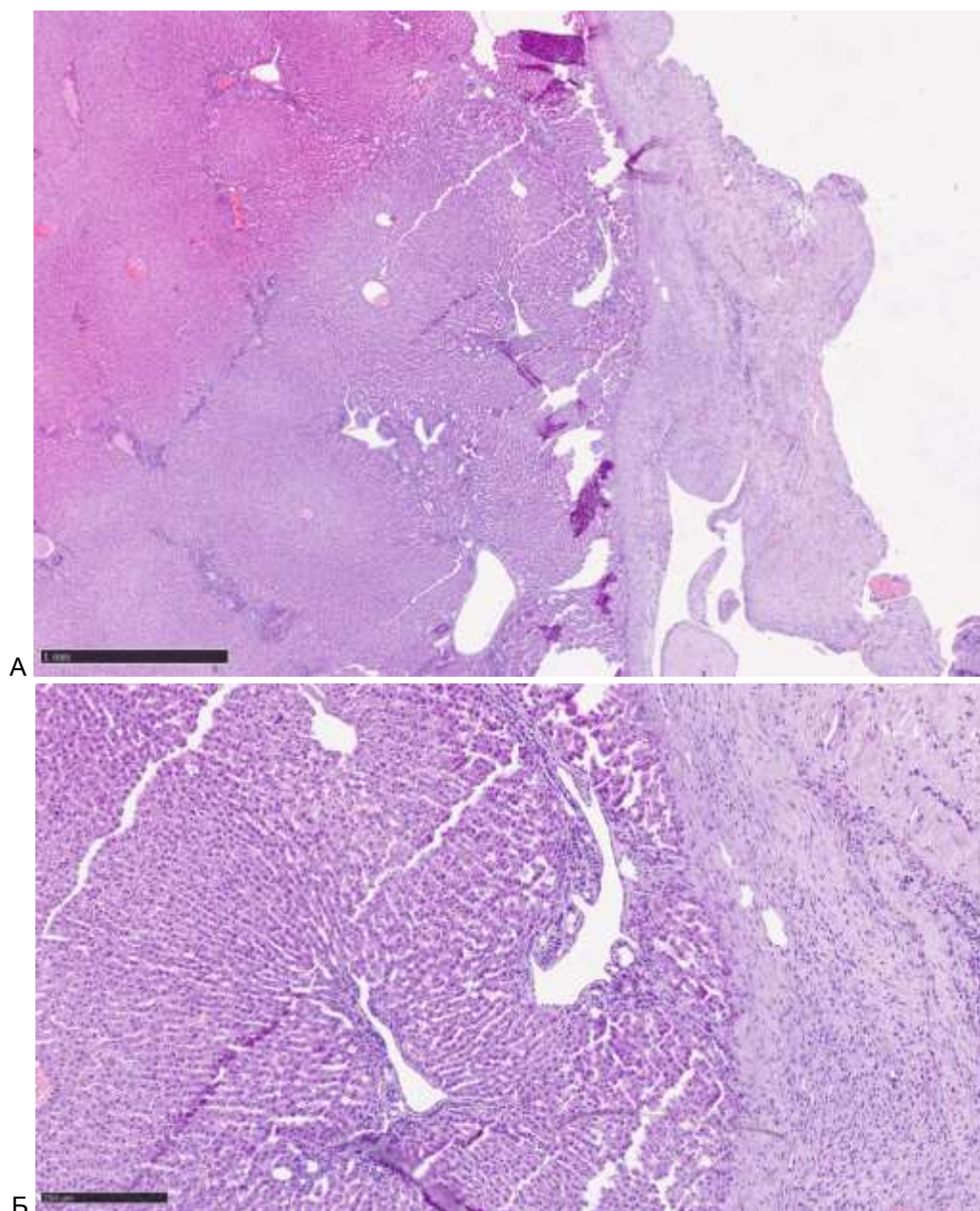
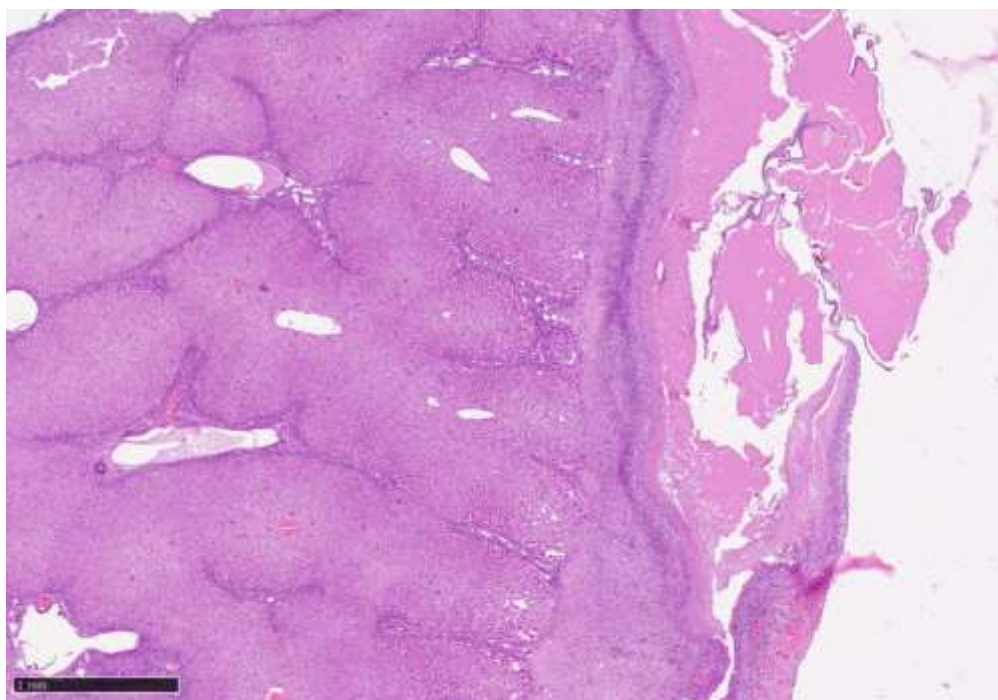


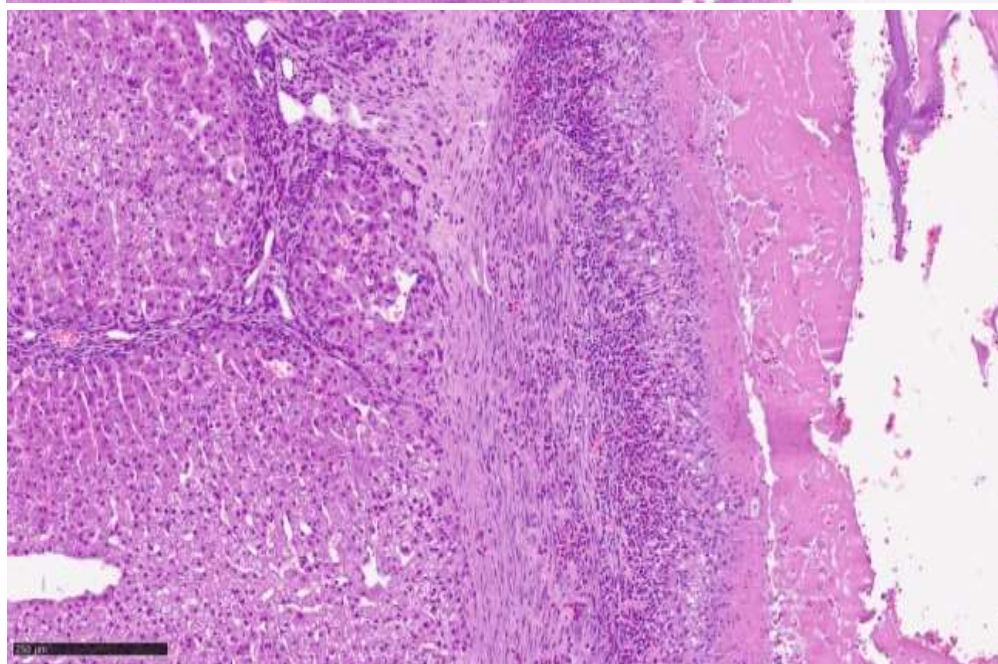
Рисунок 3. Микрофотография участка печени при использовании Такохомб. Окр. Г+Э. А - ув.40, Б - ув.200.

При изучение материала аутопсийного материала печени после использования материала Surgicel Fibrillar определяется некротический дефект, заполненный аморфными массами. По периферии определяется умеренно выраженная полиморфноклеточная инфильтрация и утолщение собственной капсулы

печени. Непосредственно под участком некроза определяется рубцовые изменения тканей печени с полиморфноклеточной инфильтрацией. В рядом располагающемся участке рубцовые изменение более выражены без воспалительных изменений.



A



Б

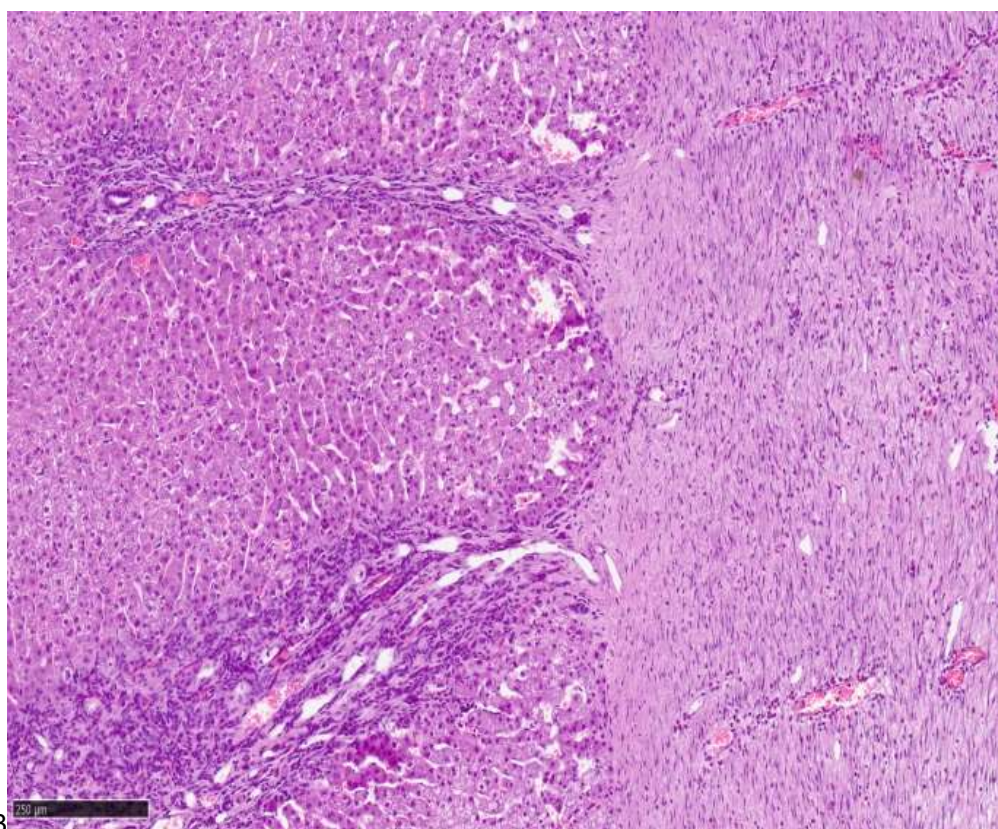


Рисунок 4. Микрофотография участка печени при использовании Surgicel Fibrillar. Окр. Г+Э. А - ув.40, Б – 200. В- ув.200.

Таблица 2. Толщина периимплантационной капсулы в исследуемых группах, Ме [25;75]

Группа	Толщина капсулы вокруг объекта, мкм
Группа №1 Двухкомпонентное губчатое средство на основе Na-КМЦ средней и высокой вязкости	0,15 [0,13; 0,18]
Группа №2 «ТахоКомб», кровоостанавливающая пористая пластина с нанесенным фибриногеном и тромбином	0,67 [0,38; 0,83]
Группа №3 Surgicel Fibrillar, 7-слойный гемостатический материал на нетканой основе	0,53 [0,43; 0,72]
p_1	0,01*
p_2	0,025*
p_3	0,054

Примечание: * – статистически значимые значения ($p \leq 0,05$);

p_1 – уровень значимости при сравнении групп № 1 и № 2;

p_2 – уровень значимости при сравнении групп № 1 и № 3;

p_3 – уровень значимости при сравнении групп № 2 и № 3.

Выводы. Таким образом, по итогам проведенного морфологического исследования было обнаружено, что все тестируемые материалы фрагментарно определялись в зоне травматизации тканей печени. Также отмечено наличие выраженной демаркационной зоны, отделяющей материалы изучаемых образцов от паренхимы печени, за счет разрастания

соединительной ткани, как итога воспалительной реакции тканей поврежденного органа. Однако степень выраженности данных процессов отличается в экспериментальных группах. Так, в группе № 1 ширина капсулы 4,4 и 3,5 раз меньше значений образцов групп № 2 и № 3 соответственно. Это опосредованно говорит о менее выраженном течении воспалительных и

регенеративных процессов, направленных на ограничение зоны травматизации. Данное утверждение подтверждается статистически значимыми отличиями клеточного состава капсулы (в группе №1 преобладают клетки фибробластического ряда, и их число превышает значения группы №2 и группы №3).

Литература.

1. Чижиков Г.М. Сравнительный анализ гемостатической активности новых средств для остановки капиллярно-паренхиматозного кровотечения (эксперимент in vivo) Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2012;5(2):391-393.
2. Липатов В.А., Денисов А.А., Петросян С.Э., Клименко А.Е., Панов А.А., Бобровская Е.А. Оценка эффективности применения двухкомпонентных губчатых кровоостанавливающих средств в остром опыте in vivo. Человек и его здоровье. 2022;25(4):5-10. <https://doi.org/10.21626/vestnik/2022-4/01>.
3. Северинов, Д. А. Швы паренхиматозных органов: преимущества и недостатки / Д. А. Северинов, А. А. Денисов, Т. Т. Ананян // Проблемы гемостаза в хирургии XXI века : Сборник трудов университетской конференции студентов и молодых ученых, Курск, 18–19 мая 2017 года / Лазаренко В.А., Липатов В.А., Лазаренко С.В.. – Курск: Курский государственный медицинский университет, 2017. – С. 17-20.
4. Attard JA, MacLean AR. Adhesive small bowel obstruction: epidemiology, biology and prevention. Can J Surg. 2007 Aug; 50(4):291-300. PMID: 17897517; PMCID: PMC2386166.
5. Сравнительная оценка эксплуатационных свойств кровоостанавливающих аппликационных имплантов / А. А. Панов, В. А. Липатов, Д. А. Северинов [и др.] // Человек и его здоровье. – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 17-23. – DOI 10.21626/vestnik/2021-4/03.
6. Аюшинова Н.И., Григорьев Е.Г., Чепурных Е.Е., Шурыгина И.А. Спаечная болезнь - нерешенная проблема абдоминальной хирургии. Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2018;153(2):5-8.
7. Сопуев А.А., Маматов Н.Н., Ормонов М.К., Эрнисова М.Э., Кудаяров Э.Э., Бауров А.Б. Этиология и патогенез спаечного процесса брюшной полости (Обзор литературы). - Вестник КГМА им. И.К. АХУНБАЕВА, 2020;3(3):37-45.
8. Солдатова Д.С., Бежин А.И., Кудрявцева Т.Н. Изучение влияния концентрации натрий-карбоксиметилцеллюлозы на кровоостанавливающую и противоспаечную активность при операциях на печени в эксперименте. Сеченовский вестник. 2020;11(1):4–14. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.1.4-14>
9. Липатов В.А., Ершов М.П., Сотников К.А., Ушанов А.А., Новикова Н.В., Константинова Ю.Е. Современные тенденции применения локальных аппликационных кровоостанавливающих средств. Innova. 2016;2(3):64–69.
10. T. M. Charlesworth, [P. Agthe](#), [A. Moores](#), [D. M. Anderson](#). The use of haemostatic gelatin sponges in veterinary surgery. Journal of Small Animal Practice. – 2012;53(1):51–56. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01162.x>
11. Буренков П. В., Смирнов В. А., Чадова Н. Н., Шестаков В. Н. Гуманное обращение с лабораторными животными как неотъемлемая составляющая доклинических исследований лекарственных средств. Ремедиум. 2021;(4):47—56. doi:10.32687/1561-5936-2021-25-4-47-56.