

УДК: 616-005.1-08-089:541,6:539,23

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА «ГЕПРОЦЕЛ» НА МОДЕЛИ РАНЫ ПЕЧЕНИ

М.М. АЛИМОВ, Р.А. САДЫКОВ, Б.А. ИСМАИЛОВ, Б.М.МИРЗАХМЕДОВ, О.В. КИМ
АО «Республиканский специализированный Центр хирургии им. акад. В.Вахидова»,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

ЖИГАР ЖАРОХАТИ МОДЕЛИДА “ГЕПРОЦЕЛ” ГЕМОСТАТИК ВОСИТАСИ САМАРАДОРЛИГИНИНГ МОРФОЛОГИК БАХОСИ

М.М. АЛИМОВ, Р.А. САДЫКОВ, Б.А. ИСМАИЛОВ, Б.М.МИРЗАХМЕДОВ, О.В. КИМ
АЖ «Акад. В.Вохидом номидаги Республика ихтисослаштирилган хирургия Маркази»,
Ўзбекистон Республикаси, Тошкент

MORPHOLOGIC EVALUATION OF HAEMOSTATIC AGENT “HEPROCEL” EFFECTIVENESS USING THE LIVER INJURY MODEL

M.M. ALIMOV, R.A. SADYKOV, B.A. ISMAILOV, B.M. MIRZAHMEDOV, O.V. KIM
Republican Specialized Surgery Center named after acad. V. Vahidov, Republic of Uzbekistan, Tashkent

Янги ишлаб чиқарилган кукун шаклидаги Гепроцел гемостатик воситасининг экспериментал текиширувлари 198±2,7г. вазни 60 та оқ зотсиз каламушларда ўтказилди. Морфологик ўзгаришлар операциядан кейинги 3, 12 соат, ҳамда 1, 3, 7, 14 ва 30 кундан сўнг текишиб кўрилди. Бунда уларнинг макроскопик ва микроскопик ўзгариш жиҳатлари ўрганилди. Ўтказилган текиширув натижалари Гепроцел гемостатик воситаси паренхиматоз қон кетишини самарали тўхтатишини кўрсатди. Микроскопик кузатувлар жигар юзасидаги жароҳатнинг юпқа бириктирувчи тўқимали чандик ҳосил бўлиши билан аста-секин бтишини кўрсатди. Гепроцел гемостатик кукунига, организм учун ёт модда сифатида, эрта муддатларда енгил морфологик жараён кўринишида яллигланиш ҳосил бўлиб, имплантат сўрилиши даврида тезда камайиб боради. Назорат гуруҳида эса худди шу давр мобайнида яллигланиш жараёнининг кучайиб бориши кузатилди. Гепроцел кукунни организмда қўлланилганда 14–21 кун ичида тўлиқ сўрилиб кетиши кузатилди. Шундай қилиб, кукун шаклидаги янги Гепроцел қон тўхтатувчи воситаси паренхиматоз қон кетишини тўхтатувчи сифатида жароҳат ва операциядан кейин қўлланилиши мумкин.

Калит сўзлар: гемостаз, гемостатик кукун, жигар морфологияси, паренхиматоз қон кетиши.

Experimental study of new polycomposition haemostatic powder was performed. 60 white male rabbits with weight 198 + 2,7 g were used. Morphologic alterations were studied at 3, 12 hours, 1, 3, 7, 14, 30 days after the operation. Results revealed the haemostatic effect of Heprocel powder. Microscopic data showed the gradual healing of the liver wound forming the thin connective tissue in injured zone. The slight inflammation developed as foreign body reaction, which reduced with implant biodegradation. Inflammation signs were manifested in the control group. The complete biodegradation of haemostatic powder Heprocel was registered on 14 – 21 days. Thus, the new haemostatic agent Heprocel might be used for parenchymal bleeding control in trauma and operation.

Key words: haemostasis, haemostatic powder, liver morphology, parenchymal bleeding.

Успехи современной хирургической гепатологии основаны на результатах научных достижений в области медицинских технологий по обеспечению гемостаза с использованием аппаратов, а также гемостатиков местного действия [4, 7, 13, 15]. Применение производных целлюлозы в качестве гемостатического средства нашло применение в различных сферах хирургии, в том числе хирургии печени [5, 6, 10, 17]. Наибольшее применение получила окисленная регенерированная целлюлоза, которая выпускается для клинического применения в трёх разновидностях: ткань тонкого плетения (Surgicel Original); прочного трикотажного полотна (Surgicel Nu-Knit); в виде волокнистого материала, предназначенного для введения в труднодоступные места (Surgicel Fibrillar). Механизм гемостатического действия

окисленной целлюлозы Surgicel (США) заключается в её кислой (pH 2,5 – 3,0) среде, что создает благоприятные условия для формирования тромбоцитарного сгустка. Она же в зоне повреждения способствует неспецифической противомикробной активности [1]. Окисленная целлюлоза обладает хорошей биосовместимостью, не токсична, химически инертна, не растворима в воде. Биологическая деградация окисленной целлюлозы зависит от степени ее окисления и состава, и наступает в течение 2-4 недель [3, 16]. Другое гемостатическое средство Traumastem (Индия) состоит из нерегенерированной окисленной целлюлозы. Механизм гемостатического действия Traumastem сходный с таковым Surgicel. Остановка кровотечения достигается в течение 2 – 6 минут [8]. Сравнительное исследование Traumastem и

Surgicel выявило наиболее высокую гемостатическую активность не регенерированной окисленной целлюлозы. Traumastem и Surgicel оказались равными по уровню pH и бактерицидным свойствам [14]. Недостатком гемостатических средств на основе окисленной целлюлозы является кислая среда, которая инактивирует естественные факторы свертывания (тромбин), а также необходимость извлечения имплантата после остановки кровотечения. Окисленная целлюлоза (ОЦ) может вызвать воспаление окружающих тканей и замедлить процесс заживления. [4]. Были зарегистрированы случаи набухания Surgicel с последующим сдавливанием нервных структур [9].

Для оценки биосовместимости имплантатов принято проводить морфологические исследования воспалительной реакции тканей. Применяется система баллов, которая учитывает степень клеточной и тканевой реакции в различные сроки [11]. При процессах деградации имплантата может наблюдаться также тканевая реакция, которая должна быть прослежена по мере возврата гистологической картины к норме [12].

Материал и методы исследования: В качестве местного гемостатического средства использован имплантат Гепроцел в виде порошка, разработанный в АО «РСЦХ им. акад. В. Вахидова» совместно с Научно-исследовательским центром химии и физики полимеров при НУУз (Патент РУз № IAP 20160273). Имплантат имеет существенные отличия от известных гемостатических средств качественным и количественным составом из производных целлюлозы [2] и включает натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, связанную с ионами кальция во взаимодействии с окисленной целлюлозой и наноцеллюлозой.

Экспериментальные исследования нового композиционного порошкового гемостатического материала Гепроцел были проведены в соответствии с ISO 10993-6-2011. Были использованы 60 белых половозрелых беспородных крыс самцов, (30- контрольная и 30-опытная группы) весом $198 \pm 2,7$ г. Морфологические изменения изучены в сроки 3, 12 часов и далее на 1-, 3-, 7-, 14- и 30-е сутки после операции. Были проведены макроскопические и светооптические микроскопические исследования. Методика эксперимента: под общим обезболиванием производилась лапаротомия. На поверхности левой доли печени с использованием абразивного материала моделировалась плоскостная рана диаметром до 1 см, глубиной до 0,3 см. На кровоточащую рану печени наносили 100 мг Гепроцел в виде мелкодисперсного порошка. Время и стойкость гемостаза оценивалась визуально в течение 15 минут. После восстановления целостности брюшной стенки, проводили наблюдение за животными в течении 30 дней. Животных выводили из эксперимента согласно

рекомендациям ISO10993-2 для оценки макроскопических изменений, а также забора материала для гистологических исследований. В группе контроля гемостаз из раны печени осуществлялся использованием полоски марли (100мг) равной по весу порошка. Кровопотерю измеряли по методу Е.М. Левитэ. Для морфологического исследования с помощью световой микроскопии ткань фиксировали в 10-12% растворе формалина на фосфатном буфере. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Изучение и фотографирование светооптических препаратов проводили с помощью микроскопа Биолам-2 и цифровой камеры Canon 14.1 Мп.

Для оценки гистологических изменений в печени применена система баллов согласно ISO 10993-6-2011, в которой учитывались параметры полуколичественной оценки числа и распределения клеток, характеризующих воспалительный процесс, таких как полиморфноядерные нейтрофилы, лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги, эозинофилы и многоядерные клетки. При микроскопии оценивали динамику развития воспалительной реакции, особенности регенерации паренхимы печени, а также степень деструкции исследуемого имплантата. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel 2010 методом вариационной статистики с оценкой значимости показателей ($M \pm m$) и различий рассматриваемых выборок по t-критерию Стьюдента. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне значимости 95% ($P < 0,05$).

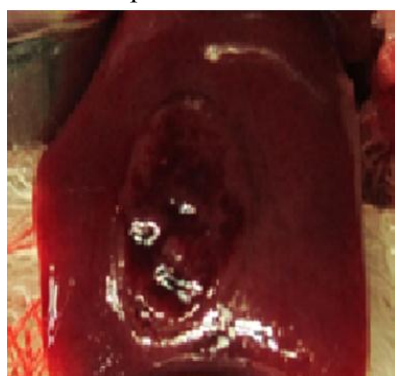
Результаты исследований. При формировании модели раны печени отмечено паренхиматозное смешанное кровотечение (рис. 1а). В группе контроля полный гемостаз из раны печени достигался через 270 ± 15 сек, а при наблюдении в течение 10 мин рецидив кровотечения отмечен в 30% случаев. В основной группе животных применение гемостатического порошка привело к гемостазу в течение 101 ± 5 сек (рис. 1б). Наблюдение в течение 10 минут не выявило случаев возобновления кровотечения. В последующие сроки все животные основной группы оставались активными без клинических проявлений кровопотери или интоксикации.

Исследования, проведенные в динамике, позволили установить, что через 1 и 3 часа после операции имплантат сохранялся на поверхности печени в виде белого налета и не отделялся от раневой поверхности. Через 12 часов в брюшной полости наличие свободной жидкости не выявлено, отмечался рыхлый спаечный процесс с вовлечением передней брюшной стенки. На поверхности раны визуализировался плотный фибриновый налет. При макроскопическом исследовании на 1-

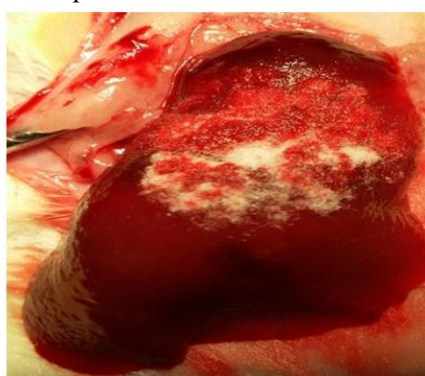
е сутки в брюшной полости отмечался рыхлый спаечный процесс с вовлечением большого сальника, выраженное покрытие раневой поверхности фибрином. На 3-и сутки в брюшной полости отмечался умеренный спаечный процесс с вовлечением участка большого сальника. Петли тонкого кишечника в процесс не вовлечены. Отмечено незначительное уменьшение фибринового налета (рис. 1с). На 30-е сутки после операции рана печени оказалась полностью зажившей без рубцевания и инфильтрации (рис. 1d). В группе контроля при макроскопическом исследовании на 1-е сутки в брюшной полости отмечался незначительный слизисто-гнойный выпот и массивный спаечный процесс с вовлечением большого сальника. При макроскопической оценке на 3-, 7-, 14-е сутки в контрольной группе, имело место постепенное нарастание признаков воспаления, выраженный спаечный процесс и формирование гнойных абсцессов. Летальный исход наблюдался у 17% животных в контрольной группе. При гистологическом исследовании через 3 часа отмечался воспалительный процесс, характеризующийся наличием в поле зрения полиморфноядерных нейтрофилов - $18,1 \pm 0,6$, лимфоцитов - $14,3 \pm 0,8$, плазматических клеток - $4,4 \pm 0,4$, макрофагов - $2,5 \pm 0,2$. Порошок фиксирован к ране печени с признаками остановившегося кровотечения. На раневой поверхности печени имелось значительное количество гемолизированных эритроцитов, свидетельствующее об их появлении в момент травмы, а также множество микротромбов в сосудах, указывающих на гемостатический эффект имплантата (рис. 1е). Микроскопически через 12 часов отмечается некротическая ткань в зоне повреждения

толщиной до 120 мкм. Отмечается воспалительный процесс с увеличением количества полиморфноядерных нейтрофилов до $27,3 \pm 0,9$, лимфоцитов - $18,8 \pm 0,9$, плазматических клеток - $5,8 \pm 0,3$, макрофагов - $10 \pm 0,3$ в поле зрения (рис. 1f). На 7-е сутки эксперимента в брюшной полости сохранялся спаечный процесс. Отмечалось уменьшение фибринового налета. Микроскопически отмечается фиброз капсулы печени с уменьшением (воспалительного инфильтрата, выражающий в виде уменьшения) количества полиморфноядерных нейтрофилов до $4,7 \pm 0,6$, лимфоцитов - $7,7 \pm 0,4$, плазматических клеток - $1,5 \pm 0,3$. Толщина некротического слоя составила 70 мкм. (рис. 1g). На 14-е сутки макроскопически спаечный процесс в печени и брюшной полости полностью не исчезает. Микроскопически отмечается усиление регенераторных процессов в паренхиме, особенно в зоне повреждения, которые проявляются восстановлением балочного строения печени, исчезновением отека и полнокровия, уменьшение толщины фиброзной пленки печени до 10 - 15 мкм. Отмечается умеренная лимфоидная инфильтрация капсулы печени с уменьшением в поле зрения количества полиморфноядерных нейтрофилов - $1,3 \pm 0,4$, лимфоцитов - $5,9 \pm 0,4$, плазматических клеток - $1,2 \pm 0,2$. (рис. 1h). Фрагменты гемостатического порошка не определяются.

По сравнению с опытной группой в контрольной группе на 7-е сутки количество: полиморфноядерных нейтрофилов - до $22,5 \pm 0,7$, лимфоцитов - $27,8 \pm 0,8$, плазматических клеток - $8,5 \pm 0,5$, макрофаги - $4,6 \pm 0,3$, которые отражены в таблице 1.



a



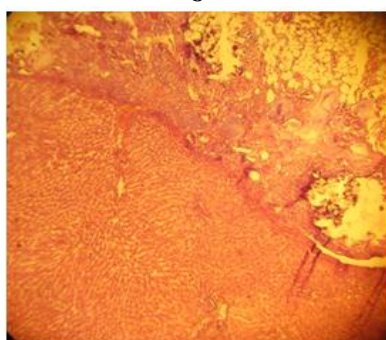
b



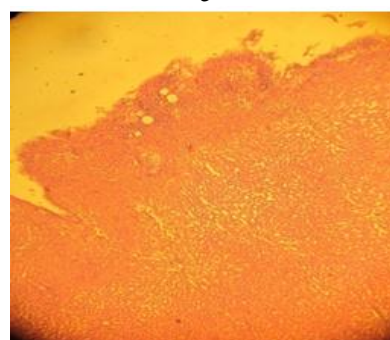
c



d



e



f

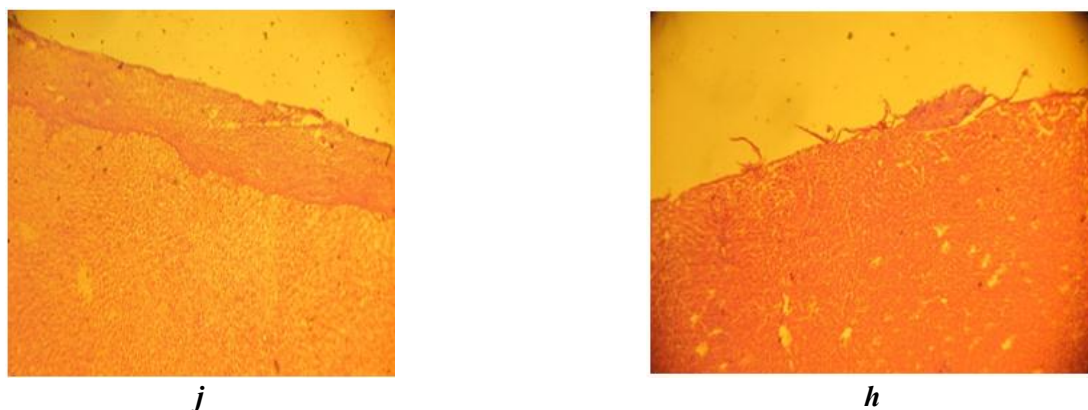


Рис. 1. Применение гемостатического средства «Гепроцел». **а** - Сформированная рана печени с паренхиматозным кровотечением; **б** – Остановка кровотечения с помощью гемостатического порошка Гепроцел; **с** – Рана печени на 3-и сутки после операции. Поврежденная поверхность сухая, покрыта фибрином и остатками порошка Гепроцел; **д** – Поверхность печени на 30-е сутки после операции; **е** – Гепроцел. Ткань печени через 3 часа. СМ. Окраска Г-Э. УВх76. Лейкоцитарный вал 100 мкм, с воспалительным процессом. Уменьшение слоя кровоизлияния; **ф** – Гепроцел. Ткань печени через 12 часов. СМ. Окраска Г-Э. УВх76. Толщина фибрина до 120 мкм. Присутствие нейтрофилов и лейкоцитов в субкапсулярной зоне; **г** – Гепроцел. Ткань печени через 7 суток. СМ. Окраска Г-Э. УВх76. Фиброз ткани - 70 мкм; **з** - Гепроцел. Ткань печени через 21 сутки. СМ. Окраска Г-Э. УВх76. Значительное уменьшение признаков воспаления и зоны фиброза до 20 мкм.

Таблица 1.

Сравнительная оценка воспалительной реакции печени опытной и контрольной группы

Срок после операции	Элементы воспаления				Толщина фиброзного слоя
	Полиморфно-ядерные нейтрофилы	Лимфоциты	Плазматические клетки	Макрофаги	мкм
Опытная группа					
3 часа	18,1±0,6	14,3±0,8	4,4±0,4	2,5±0,2	101±2,9
12 часов	27,3±0,9	18,8±0,9	5,8±0,3	10±0,3	147±4,1
1-е сутки	29,8±0,7*	13,2±0,7*	2,9±0,4*	7,7±0,3*	115±3,8*
3-и сутки	10,3±0,7	7,6±0,4	1,6±0,3	0,7±0,2	93±4,6
7-е сутки	4,7±0,6**	7,7±0,4**	1,5±0,3**	0**	68±5,3**
14-е сутки	1,3±0,4*	5,9±0,4*	1,2±0,2*	0*	19,8±2,3*
30-е сутки	0	0,9±0,2	0,2±0,1	0	9,5±1,0
Контрольная группа					
7-е сутки	22,5±0,7**	27,8±0,8**	8,5±0,5**	4,6±0,3**	гнойный** абсцесс
30-е сутки	плотные упаковки	обильная ин- фильтрация	большое количе- ство	большое количество	плотный рубец

* $P < 0,05$ по отношению ранние сроки заживления раны

** $P < 0,05$ в сравнении с контрольной группой в эти сроки

Из приведенных данных можно сделать заключение, что имплантат Гепроцел вызывает на 1-е сутки морфологическую реакцию печени в виде воспаления, но эти процессы быстро стихают. На 14 – 21-е сутки наблюдается полное рассасывание имплантата. К 30-м суткам после имплантации наблюдаются регенераторные процессы в паренхиме печени, особенно в зоне повреждения, что свидетельствует о восстановлении ткани печени. В контрольной группе в эти же сроки наблюдалось нарастание признаков воспаления.

Выводы. Таким образом, проведенные исследования показали, что порошок Гепроцел плотно адгезируется к ткани печени, останавливает паренхиматозное кровотечение. Световая микроскопия раневой поверхности печени выявила

значительное количество гемолизированных эритроцитов и множество микротромбов в сосудах, указывающих на гемостатический эффект имплантата. Микроскопически наблюдается постепенное заживление раны печени с формированием в зоне повреждения тонкого соединительнотканного рубца. При применении Гепроцел, в ранние сроки развивалась не выраженная морфологическая реакция в виде воспаления, которое быстро стихало по мере рассасывания имплантата. По сравнению с опытной группой в контрольной группе на 7-е сутки количество элементов воспаления увеличилось в 4 раза. На 21-е сутки микроскопически фрагменты гемостатического порошка не определялись, что свидетельствует о его полной биodeградации. Согласно системе баллов ISO 10993-6-2011, контрольный фактор

признан раздражителем – более 15 баллов, а исследуемый гемостатический порошок Гепроцел была оценен как не раздражающий агент - 2 балла.

Литература:

1. Геньш К.В., Базарнова Н.Г. Окисленная целлюлоза. Получение. Применение в медицине. // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 13-20.
2. Назыров Ф.Г., Садыков Р.А., Сарымсаков А.А., / Гепроцел новый гемостатический имплантат для хирургии печени. // Хирургия Узбекистана, 2016г. № 1. С. 61 – 68.
3. Таркова А.Р., Чернявский А.М., Морозов С.В., Григорьев И.А., Ткачева Н.И. / Гемостатический материал местного действия на основе окисленной целлюлозы // Сибирский научный медицинский журнал 2015; том 35, №3, С. 11-15
4. Achneck HE, Sileshi B, Jamiolkowski RM, Albala DM, Shapiro ML, Lawson JH. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. *Ann Surg.* 2010;251(2):217-228. doi:10.1097/SLA.0b013e3181c3bcca.
5. Bouras, A.F. Management of blunt hepatic trauma. *Journal of Visceral Surgery.* 2010; 10:004: 351-358.
6. Brustia R, Granger B. An update on topical haemostatic agents in liver surgery: systematic review and meta-analysis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016. doi:10.1002/jhbp.389.
7. Dokmak S, Ftériche FS, Borscheid R, Cauchy F, Farges O, Belghiti J. Liver resections in the 21st century: we are far from zero mortality. *HPB (Oxford).* 2013;15:908–15.
8. Habal P, Omran N, Mand'ák J, Simek J, Stetina M. Controlled hemostasis in thoracic surgery using drugs with oxidized cellulose. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2011;54(4):153-156.
9. Henry MCW, Tashjian DB, Kasowski H, Duncan C. Postoperative paraplegia secondary to the use of oxidized cellulose (Surgicel). *J Pediatr Surgery* 40 (pp E9-E11), 2005 Date Publ April 2005. 2005;(4):E9-E11. doi:10.1016/j.jpedsurg.2005.01.032.
10. Huntington JT, Royall NA, Schmidt CR. Minimizing blood loss during hepatectomy: a literature review. *J Surg Oncol.* 2014;109:81–8
11. Ikarasi Y., Tsuchiya T., Toyoda K., Kobayashi E., Doi H., and Hamanaka H., / Tissue Reactions and Sensitivity to Iron Chromium Alloys, // *Mater Trans*, 2002, 43, pp.3065-3071.
12. Jensen SS, Yazdi PM, Hjørtting-Hansen E, von Arx T. Haemostatic effect and tissue reactions of methods and agents used for haemorrhage control in apical surgery. *Int Endod J.* 2010;43(1): 57–63.
13. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Yamashita K, et al. Perioperative management of hepatic resection toward zero mortality and morbidity: analysis of 793 consecutive

cases in a single institution. *J Am Coll Surg.* 2010;211:443–9.

14. Lewis K. M., Spazierer D., Urban M. D., Lin L., Redl H., Goppelt A. Comparison of regenerated and non-regenerated oxidized cellulose hemostatic agents. *Eur Surg.* 2013; 45(4): 213–220.

15. Malone DL, Dunne J, Tracy JK, Putnam AT, Scalea TM, Napolitano LM. Blood transfusion, independent of shock severity, is associated with worse outcome in trauma. *J Trauma.* 2003;54(5):898–905; discussion 905–907.

16. Schuhmacher C, Pratschke J, Weiss S, Schneeberger S, Winkler M, Emmanouilidis N. Safety and effectiveness of a synthetic hemostatic patch for intraoperative soft tissue bleeding. 2015:167-174

17. Seyednejad H, Imani M, Jamieson T, Seifalian AM. Topical haemostatic agents. *Br J Surg.* 2008;95(10):1197–1225.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА «ГЕПРОЦЕЛ» НА МОДЕЛИ РАНЫ ПЕЧЕНИ

М.М. АЛИМОВ, Р.А. САДЫКОВ,
Б.А. ИСМАЙЛОВ, Б.М. МИРЗАХМЕДОВ,
О.В. КИМ

Экспериментальные исследования нового композиционного порошкового гемостатического средства Гепроцел были проведены у 60 белых половозрелых беспородных крыс самцов, весом $198 \pm 2,7$ г. Морфологические изменения изучены в сроки 3, 12 часов и далее на 1-, 3-, 7-, 14- и 30-е сутки после операции. Были проведены макроскопические и микроскопические исследования. Проведенные исследования показали, что порошок Гепроцел эффективно останавливает паренхиматозное кровотечение. Микроскопически наблюдается постепенное заживление раны печени с формированием в зоне повреждения тонкого соединительнотканного рубца. На гемостатический порошок Гепроцел, как инородное тело, в ранние сроки развивалась не выраженная морфологическая реакция в виде воспаления, которое быстро стихало по мере рассасывания имплантата. В контрольной группе в эти же сроки наблюдалось нарастание признаков воспаления. Полное рассасывание гемостатического порошкового имплантата происходит на 14 – 21-е сутки. Таким образом, новый гемостатический материал в виде гемостатического порошка «Гепроцел» может быть применен для остановки паренхиматозных кровотечений при травмах и операционных кровопотерях.

Ключевые слова: гемостаз, гемостатический порошок, морфология печени, паренхиматозное кровотечение.