

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КРОВООСТАНАВЛИВАЮЩИХ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ НАТРИЙ-КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ПОМОЩЬЮ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Липатов В.А.¹, Григорьев Н.Н.¹, Лазаренко С.В.¹, Северинов Д.А.¹, Сотников К.А.¹, Ушанов А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, e-mail: dmitriy.severinov.93@mail.ru

Данная статья посвящена изучению изменений структуры кровоостанавливающих имплантов на основе натрий-карбоксиметилцеллюлозы при добавлении в состав образцов различных лекарственных средств, обладающих системным гемостатическим действием: аминокaproновой, аминокусусной и ацетилсалициловой кислот. Авторы выполняли световую микроскопию образцов, фотографирование и последующую обработку полученных фотографий с помощью графического редактора Adobe Photoshop CC (версия 13.1.02) для получения контрастных изображений. После этого производили измерение элементов структуры импланта (трабекул и пор), расчет величин коэффициентов оптической плотности и шероховатости, статистическую обработку полученных результатов. Согласно полученным данным следует, что при добавлении вышеуказанных лекарственных веществ к импланту изменяется его микроскопическая структура: увеличивается количество трабекул, снижается пористость, происходит выравнивание поверхности образцов. Это приводит к уменьшению адгезивной способности импланта. При сопоставлении с результатами ранее выполненных авторами исследований *in vivo* выяснилось, что лучшей гемостатической активностью обладают образцы с наименьшей оптической плотностью и наибольшим значением коэффициента шероховатости. Таким образом, добавление лекарственных средств к импланту изменяет его структурные характеристики, в том числе пористость и адгезивную способность, влияет на его гемостатическую активность.

Ключевые слова: кровоостанавливающие импланты, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, остановка кровотечения, световая микроскопия, микроскопическая структура, гемостатическая губка.

STRUCTURAL FEATURE OF HAEMOSTATIC IMPLANTS BASED ON SODIUM-CARBOXYMETHYLCELLULOSE USING LIGHT MICROSCOPY

Lipatov V.A.¹, Grigoriev N.N.¹, Lazarenko S.V.¹, Severinov D.A.¹, Sotnikov K.A.¹, Ushanov A.A.¹

¹FGBOU VO "Kursk State Medical University Ministry of Health of Russia", Kursk, e-mail: kurskmed@mail.ru

This article is devoted to the study of changes in the structure of hemostatic implants based on sodium-carboxymethylcellulose when various drugs with systemic hemostatic action are added to the composition of samples: aminocaproic, aminoacetic and acetylsalicylic acids. Performed light microscopy of the samples, photographing and subsequent processing of the photographs were performed using Adobe PhotoShop CC (version 13.1.02) graphic editor to obtain contrast images. After that, the elements of the implant structure were measured (trabeculae and pores), the calculation of the values of the optical density and roughness coefficients, and the statistical processing of the results obtained. According to the data obtained, it follows that the addition of the above-mentioned medicinal substances to the implant changes its microscopic structure: the number of trabeculae increases, the porosity decreases, and the surface of the samples is flattened. This leads to a decrease in the adhesive ability of the implant. When compared with the results of previously performed *in vivo* studies by the authors, it turned out that the samples with the lowest optical density and the highest roughness coefficient have the best hemostatic activity. In this way, the addition of drugs to the implant changes its structural characteristics, including porosity and adhesive ability, affects its hemostatic activity.

Keywords: hemostatic implants, sodium-carboxymethylcellulose, bleeding wound, light microscopy, microscopic structure, hemostatic sponge.

В абдоминальной хирургии остановка кровотечений при проведении оперативных вмешательств на паренхиматозных органах остается одной из актуальных проблем. Зачастую паренхиматозные кровотечения сопровождаются существенной кровопотерей, высокой

интенсивностью кровотечения и останавливаются с трудом, что связано с анатомической особенностью паренхиматозных органов [1].

Клинический опыт показывает, что при плановых хирургических вмешательствах на печени, почках, селезенке при целостности магистральных артерий и вен капиллярно-паренхиматозные кровотечения являются основными источниками операционной кровопотери [2]. Для его остановки прибегают к различным методам физического воздействия, оказываемого с помощью специальной дорогостоящей аппаратуры (местная гипотермия, лазерное облучение, аппликация жидким азотом, термо- и ультразвуковая коагуляция и пр.), парентеральному введению лекарственных средств и продуктов свежемороженой плазмы, а также к одним из перспективных направлений – губчатым гемостатическим имплантатам, выполненным на основе коллагена, карбоксиметилцеллюлозы, желатина, хитозана, фибрина, а также других (в том числе полимерных) соединений [3].

Одним из главных преимуществ гемостатических имплантов на основе карбоксиметилцеллюлозы перед конкурентами является безопасность ее использования – малый иммунный ответ, а также способность к резорбции в организме [4].

Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (общая формула $[C_6H_7O_2(OH)_3-x(OCH_2COOH)_x]_n$, где $x=0,08-1,5$) – это производное целлюлозы, высокополимерный ионный электролит, в котором карбоксиметильная группа соединяется с гидроксильными группами глюкозных мономеров [5; 6]. В настоящее время КМЦ выпускается в промышленном масштабе практически во всех развитых странах и используется в целом ряде отраслей промышленности, таких как пищевая, химическая и медицинская. При этом часто используется натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), которую получают при смешивании целлюлозы и монохлоруксусной кислоты в присутствии щелочи. Водные растворы Na-КМЦ достаточно вязкие и обладают таким свойством, как псевдопластичность (ослабление без обратного принятия формы кажущейся вязкости с повышением величины градиента скорости движения параллельных слоев жидкости при изотермических и обратимых условиях) [7; 8].

Такие физико-химические свойства дают возможность использовать соединения карбоксиметилцеллюлозы в медицинских целях. Например, КМЦ успешно применяется в пластической хирургии, отоларингологии, гепатобилиарной хирургии [9] и других хирургических специальностях. Хорошие показатели гемостатической активности губок на основе карбоксиметилцеллюлозы дают основание для дальнейшего их использования. Важной задачей является изучение структурных особенностей используемых имплантов на основе КМЦ с целью их дальнейшего совершенствования.

Целью настоящего исследования являлось установление структурных особенностей кровоостанавливающих имплантов на основе карбоксиметилцеллюлозы при световой микроскопии.

Материалы и методы исследования

В качестве материалов для экспериментальных исследований были использованы следующие образцы кровоостанавливающих аппликационных имплантов на основе КМЦ, разработанных совместно с фирмой ООО «Линтекс» (г. Санкт-Петербург):

Группа № 1 – губка кровоостанавливающая на основе КМЦ (контрольная группа).

Группа № 2 – губка кровоостанавливающая на основе КМЦ с добавлением аминокaproновой кислоты.

Группа № 3 – губка кровоостанавливающая на основе КМЦ с добавлением аминоксусной кислоты.

Группа № 4 – губка кровоостанавливающая на основе КМЦ с добавлением ацетилсалициловой кислоты.

Перед началом исследований размеры всех образцов были стандартизованы (1,0x1,0x0,5 см), каждая группа включала по 10 образцов соответственно.

Для изучения структурных особенностей имплантов тестируемые образцы были помещены на предметный столик медицинского микроскопа МИКМЕД-6 (АО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург), после чего в боковом и проходящем свете проводилось микроскопирование (увеличение $\times 40$) и фотографирование с помощью C-mount (резьбовое соединение типа C) камеры E3CMOS12000KPA на основе сенсора Sony IMX226. Полученные фотографии обрабатывали в программе Adobe Photoshop CC (версия 13.1.02) для получения черно-белых изображений путем усиления контрастности. Измерение ширины трабекул и пор образцов (единицы измерения – пиксели (px)), а также подсчет черных и белых пикселей проводили с использованием программы Altami Studio (версия 3.4). Коэффициент оптической плотности ($K_{\text{опт}}$) образцов (отношение белых пикселей к черным) высчитывали в боковом свете, а коэффициент шероховатости ($K_{\text{шер}}$) образцов (отношение черных пикселей к белым) – в прямом свете. Оценивая результаты исследования, исходили из того, что min показатели оптической плотности говорят о плотном строении импланта; одновременно с этим max показатели шероховатости говорят о неоднородности характера рельефа, что увеличивает площадь поверхности импланта и позитивно сказывается на его адгезивных свойствах. Указанные выше показатели рассчитывали по формулам:

$$K_{\text{опт}} = \frac{Б}{Ч} \qquad K_{\text{шер}} = \frac{Ч}{Б}, \text{ где:}$$

Б – количество белых пикселей, Ч – количество черных пикселей.

Отметим, что ранее коллективом авторов проводилось исследование времени остановки кровотечения в эксперименте *in vivo* на 80 крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г [10], которым под общим наркозом после лапаротомного разреза моделировали поверхностные плоскостные травмы печени и селезенки с последующим наложением гемостатических имплантов таких же экспериментальных групп, измеряли время остановки кровотечения, объем кровопотери по методу Е.М. Левитэ (вычисляли разницу между массой импланта до и после наложения на рану).

Каждому образцу были присвоены ранги от 1 до 6, отражающие их гемостатическую активность, где «1» – максимальный результат, «6» – минимальный результат (таблица 2). После суммирования баллов при подведении итогов сравнения исходили из того, что наибольшее значение соответствует низкой гемостатической активности импланта и отрицательно характеризует тестируемый образец ввиду длительного кровотечения из раны органа и значительного объема кровопотери, что в случае травмы паренхиматозного органа недопустимо.

Статистическую обработку результатов настоящего исследования проводили с применением методик описательной и вариационной статистики. Производили расчет средних арифметических, стандартных отклонений и средних ошибок средних. В связи с малой выборкой ($n < 30$) в экспериментальных группах и ненормальным распределением выборки по Колмогорову-Смирнову для определения достоверности отличий средних применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. В качестве программной среды для обработки данных использовали программы Statistica (версия 6.0) и Biostatistics (версия 4.03). Статистически достоверными считались различия средних величин при допустимом для медико-биологических исследований уровне $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При микроскопии образцов группы № 1 (рисунок 1А) в боковом свете визуализируются тяжи волнообразной формы, расположенные преимущественно параллельно друг к другу на расстоянии примерно $65,3 \pm 1,5$ рх, что равно ширине пор при прямой микроскопии; также обнаружены участки импланта с хаотичным расположением перегородок; глубина тяжей при боковой микроскопии составила $60,4 \pm 2$ рх, оптическая плотность равна $1,03 \pm 0,07$, а коэффициент шероховатости равен $2,12 \pm 0,17$ – наибольшие значения показателей среди всех 4 групп.

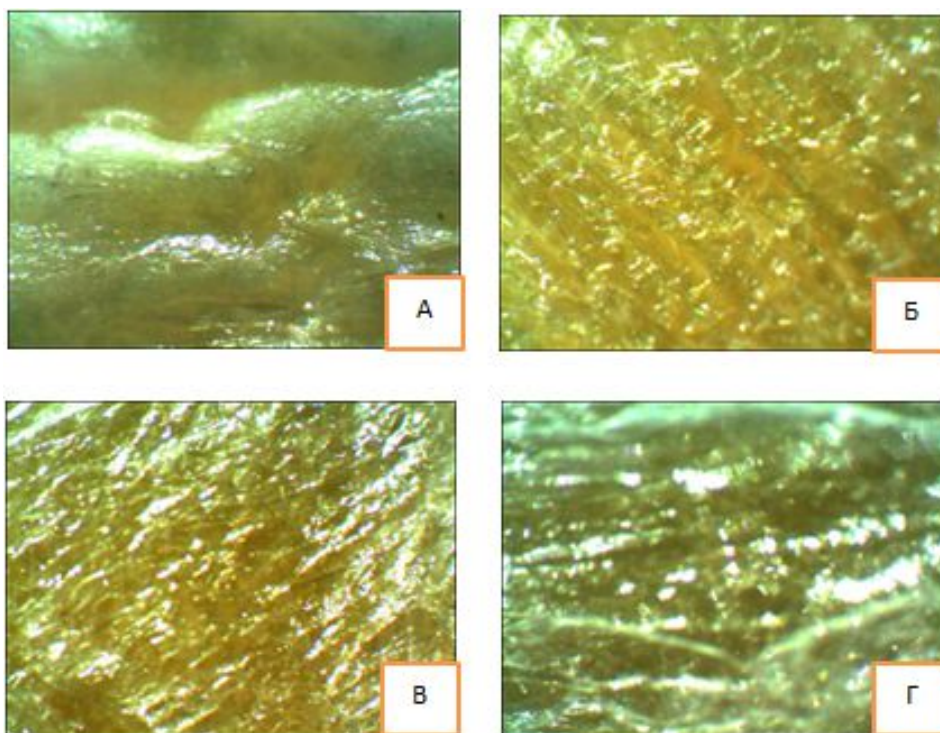


Рис. 1. Кровоостанавливающие импланты на основе КМЦ при микроскопии (ув. х40) в боковом свете: А – кровоостанавливающая губка на основе КМЦ;

Б – кровоостанавливающая губка на основе КМЦ с добавлением аминокaproновой кислоты;

В – кровоостанавливающая губка на основе КМЦ с добавлением аспаргусной кислоты;

Г – кровоостанавливающая губка на основе КМЦ с добавлением ацетилсалициловой кислоты

Используя полученные с помощью микроскопии, фотографирования, цифровой и статистической обработки результаты, были вычислены показатели, приведенные в табл. 1.

Таблица 1

Величины показателей элементов микроскопической структуры, оптической плотности и коэффициента шероховатости образцов, $M \pm m$

Показатель № группы	Ширина пор (рх)	Глубина тяжей (рх)	Оптическая плотность	Коэффициент шероховатости
Группа 1	65,3±1,5	60,4±2	1,03±0,07	2,12±0,17
Группа 2	62,28±1,4*	30,25±3,5*	1,01±0,05*	0,55±0,02*
Группа 3	10,4±2,8*	5,78±3,1*	0,31±0,03*	1,09±0,07*
Группа 4	19,88±1,7*	17±3,2*	0,86±0,08*	1,67±0,02*

Примечания: * – достоверные отличия средних арифметических ($p \leq 0,05$).

Микроскопическая структура образцов группы № 2 (рисунок 1Б) представлена параллельно расположенными трабекулами толщиной $30,25 \pm 3,5$ рх в прямом свете, глубина тяжей при боковой микроскопии $10,1 \pm 1,2$ рх, что меньше, чем у образцов контрольной группы. Поры имеют эллипсовидную форму с поперечником $62,28 \pm 1,4$ рх в наибольшем измерении. Показатель ширины пор фактически равен аналогичному показателю группы № 1, а показатель глубины тяжей меньше в 2 раза.

Образцы группы № 3 (рисунок 1В) имеют в своей структуре перегородки толщиной $9,15 \pm 2,3$ рх в прямом свете, расположенные преимущественно параллельно друг к другу, некоторые из них имеют ответвления, глубина тяжей при боковой микроскопии $5,78 \pm 3,1$ рх. Толщина пор в среднем $10,4 \pm 2,8$ рх, что примерно в 6 раз меньше аналогичных показателей контрольной группы. Подсчет числа тяжей в поле зрения микроскопа затруднен из-за их малой толщины.

Структура губок группы № 4 (рисунок 1Г) представлена хаотично расположенными трабекулами толщиной $7,2 \pm 3,7$ рх в прямом свете, глубина тяжей при боковой микроскопии $17 \pm 3,2$ рх. Поры неправильной формы, ближе к овальным, и различны по размерам, в диаметре от 9,49 до 30,27 рх. Все показатели меньше аналогичных показателей контрольной группы примерно в 4,5 раза.

При сравнении полученных результатов отметим, что образцы контрольной группы имеют максимальную пористость (оптическая плотность $1,3 \pm 0,07$), их структура представлена широкими тяжами (от 59,4 рх до 82,8 рх) и относительно широкими порами ($65,3 \pm 1,5$ рх), а также максимальным коэффициентом шероховатости ($2,12 \pm 0,17$).

Градация снижения оптической плотности прослеживается в ряду образцов с добавлением: аминокaproновой кислоты ($1,01 \pm 0,05$) → ацетилсалициловой кислоты ($0,86 \pm 0,08$) → аминокусусной кислоты ($0,31 \pm 0,03$). Также отмечается выравнивание рельефа поверхности импланта при добавлении к нему лекарственных препаратов, т.е. уменьшается его коэффициент шероховатости: КМЦ + ацетилсалициловая кислота ($1,67 \pm 0,02$) → КМЦ + аминокусусная кислота ($1,09 \pm 0,07$) → КМЦ + аминокaproновая кислота ($0,55 \pm 0,02$).

Данные, полученные в ходе проведенного ранее эксперимента на лабораторных животных *in vivo*, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Ранги, полученные образцами после эксперимента *in vivo*

Номер образца	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Исследуемый показатель				

Время кровотечения (печень)	5	4	1	2
Время кровотечения (селезенка)	6	4	2	1
Объем кровопотери (печень)	2	4	1	1
Объем кровопотери (селезенка)	6	4	1	2
Всего	19	16	5	6

В ходе исследования было установлено, что наилучшей гемостатической активностью обладают губки с добавлением аминокислоты (всего 5 баллов), а также, с несколько худшими результатами, губки с добавлением ацетилсалициловой кислоты (6 баллов). Тестируемые образцы контрольной группы и импланты с добавлением аминокaproновой кислоты, несмотря на высокую сумму баллов (19 и 16 соответственно), обладают низкой гемостатической активностью.

Заключение

На основании проведенного исследования мы пришли к выводам, что при добавлении лекарственного препарата в состав гемостатического импланта на основе карбоксиметилцеллюлозы наблюдаются изменения его микроскопической структуры. Эти изменения выражаются в уменьшении ширины пор и глубины тяжей у модифицированных губок в сравнении с губкой без добавления лекарственных веществ ($65,3 \pm 1,5$ против $62,28 \pm 1,4$, $10,4 \pm 2,8$, $19,88 \pm 1,7$ и $60,4 \pm 2$ против $30,25 \pm 3,5$, $5,78 \pm 3,1$, $17 \pm 3,2$ соответственно). Также наблюдается снижение оптической плотности в ряду: аминокaproновая кислота ($1,01 \pm 0,05$) → ацетилсалициловая кислота ($0,86 \pm 0,08$) → аминокислота ($0,31 \pm 0,03$), и снижение коэффициента шероховатости в ряду: ацетилсалициловая кислота ($1,67 \pm 0,02$) → аминокислота ($1,09 \pm 0,07$) → аминокaproновая кислота ($0,55 \pm 0,02$). По мере снижения оптической плотности также наблюдается снижение гемостатической активности. В конечном итоге наибольшей гемостатической активностью обладают импланты с добавлением аминокислоты (наименьшая ширина пор и глубина трабекул – $10,4 \pm 2,8$ и $5,78 \pm 3,1$ соответственно; наименьший показатель оптической плотности – $0,31 \pm 0,03$) и ацетилсалициловой кислот (ширина пор и глубина трабекул – $19,88 \pm 1,7$ и $17 \pm 3,2$ соответственно). После проведенного нами исследования можем с уверенностью заключить, что добавление лекарственных препаратов, оказывающих действие на систему гемостаза, положительно сказывается на эффективности гемостатических губок.

Список литературы

1. Lalountas M. A., Ballas K. D., Skouras C., Asteriou C., Kontoulis T., Pissas D.,

- Triantafyllou A., Sakantamis A.K. Preventing intraperitoneal adhesions with atorvastatin and sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose: a comparative study in rats. *The American Journal of Surgery*. 2010. vol. 200. no.1. P. 118-123.
2. Wisner D. H., Blaisdell F. W. When to save the ruptured spleen. *Surgery*. 1992. vol. 111. no. 2. P. 121-122.
3. Fonouni H., Kashfi A., Majlesara A., Stahlheber O., Konstantinidis L., Gharabaghi N., Kraus W.T., Mehrabi A., Oweira H. Hemostatic efficiency of modern topical sealants: Comparative evaluation after liver resection and splenic laceration in a swine model. *Journal of biomedical materials research*. 2017. vol. 106. no. 3. P. 1307-1316.
4. Vrijland W.W., Tseng L.N., Eijkman H.J., Hop W.C., Jakimowicz J.J., Leguit P., Stassen L. P. S., Swank D.J., Haverlag R., JaapBonjer H., Jeekel H. Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial. *Annals of surgery*. 2002. vol. 235. no. 2. P. 193-199.
5. Александров В.В., Маскин С.С., Иголкина Л.А., Ермолаева Н.К. Перспективы использования локального криогемостаза при травмах печени и селезенки // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2013. №7 (142). С. 45-51.
6. Герасимов Д.А., Новикова Н.В., Липатов В.А., Тельнов А.Н. Экспериментальная оценка динамики и степени биодеградации новых образцов кровоостанавливающих имплантов на основе карбоксиметилцеллюлозы // *Забайкальский медицинский вестник*. 2016. №. 1. С. 81-85.
7. Sardo A. D. S., Spinelli M., Bramante S., Scognamiglio M., Greco E., Guida M., Cela V., Nappi, C. Efficacy of a polyethylene oxide-sodium carboxymethylcellulose gel in prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic surgery. *Journal of minimally invasive gynecology*. 2011. vol. 18. no. 4. P. 462-469.
8. Fonouni H., Kashfi A., Majlesara A., Stahlheber O., Konstantinidis L., Gharabaghi N., Kraus W.T., Mehrabi A., Oweira H. Hemostatic efficiency of modern topical sealants: Comparative evaluation after liver resection and splenic laceration in a swine model. *Journal of biomedical materials research*. 2017. vol. 106. no. 3. P. 1307-1316.
9. Маркин В.И., Базарнова Н.Г., Галочкин А.И. О взаимодействии лигноуглеводных материалов с монохлоруксусной кислотой // *Химия растительного сырья*. 1997. №. 1. С. 26-28.
10. Константинова Ю.Е., Абросимова Н.В., Сотников К.А., Липатов В.А. Показатели кровоостанавливающей активности губок на основе карбоксиметилцеллюлозы // *Здоровье и образование в XXI веке*. 2016. №. 1. С. 142-144.