



Исследование ткани печени при местном применении новых губчатых кровоостанавливающих средств в эксперименте*

Липатов В.А., Лазаренко С.В., Иванов А.В., Северинов Д.А., Денисов А.А., Ковалева А.Е.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (ул. К. Маркса, 3, г. Курск, 305041, Россия)

Для цитирования: Липатов В.А., Лазаренко С.В., Иванов А.В., Северинов Д.А., Денисов А.А., Ковалева А.Е. Исследование ткани печени при местном применении новых губчатых кровоостанавливающих средств в эксперименте. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2024;(11): 119–127 doi: 10.31146/1682-8658-ecg-231-11-119-127

✉ Для переписки:

Северинов

Дмитрий

Андреевич

dmitriy.severinov.93

@mail.ru

Липатов Вячеслав Александрович, д.м.н., профессор, профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, заведующий лабораторией экспериментальной хирургии и онкологии НИИ Экспериментальной медицины

Лазаренко Сергей Викторович, к.м.н., доцент кафедры урологии

Иванов Александр Викторович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии

Северинов Дмитрий Андреевич, к.м.н., доцент кафедры детской хирургии и педиатрии

Института непрерывного образования

Денисов Артем Александрович, ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии

Ковалева Анастасия Евгеньевна, студентка

Резюме

* Иллюстрации

к статье –

на цветной

вклейке в журнал

(стр. VII–VIII).

Цель исследования. Изучить гистологические особенности реакции ткани печени в эксперименте *in vivo* при моделировании различных вариантов повреждений печени и применении новых образцов местных кровоостанавливающих средств

Материалы и методы. В качестве материалов исследования использовали образцы новых губчатых полимерных кровоостанавливающих средств (на основе морского коллагена, в разных соотношениях по массе с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы (три вида образцов, содержащие 15%, 25%, 50% коллагена), а также используемые в клинической практике изделия – губка гемостатическая коллагеновая, пластина коллагеновая Tachocomb. Оценивали реакцию тканей печени на использование указанных изделий в хроническом эксперименте *in vivo*: кроликам выполняли лапароскопическое моделирование трех вариантов травмы печени (тангенциальная краевая резекция правой доли, рваная рана средней доли глубиной од 1,5 см, поверхностная рана левой доли 1×1 см), при этом гемостаз осуществляли аппликацией или введением в рану тестируемых изделий. Выводили животных на 28-е сутки. Производили изготовление микропрепаратов, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методике Ван-Гизон.

Результаты. Сопоставление гистологической картины соединительной ткани в зоне экспериментального повреждения печени в условиях применения с целью гемостаза разных материалов: губка гемостатическая коллагеновая, пластина кровоостанавливающая Tachocomb, а также новые образцы показывает, что вне зависимости от типа повреждения печени (рана в толще органа, краевое повреждение или поверхностное повреждение), менее выраженную тканевую реакцию и быстрые темпы биodeградации показывает материал губки гемостатической коллагеновой.

Заключение. В сравнении с губкой гемостатической коллагеновой, применение в качестве локального средства для остановки кровотечения разработанного авторами образца на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с добавлением 15% коллагена приводит к замедлению формирования соединительной ткани вследствие «отвлечения» макрофагов на резорбцию остатков натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы.

Ключевые слова: травма печени, эксперимент, кровотечение, местные гемостатические средства, полимерные кровоостанавливающие средства, карбоксиметилцеллюлоза, пластина коллагеновая Tachocomb

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: SSUNBB



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-231-11-119-127>

Study of liver tissue with topical application of new spongy hemostatic agents in experiment*

V.A. Lipatov, S.V. Lazarenko, A.V. Ivanov, D.A. Severinov, A.A. Denisov, A.E. Kovaleva
Kursk state medical university, (3, K. Marx str., Kursk, 305041, Russia)

For citation: Lipatov V.A., Lazarenko S.V., Ivanov A.V., Severinov D.A., Denisov A.A., Kovaleva A.E. Study of liver tissue with topical application of new spongy hemostatic agents in experiment. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2024;(11): 119–127. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-231-11-119-127

✉ **Corresponding author:**

Dmitry A. Severinov
dmitriy.severinov.93@mail.ru

Vycheslav A. Lipatov, Prof, MD, PhD, professor of operative surgery and topographic anatomy department, Head of the Laboratory of Experimental Surgery and Oncology of Research Institute of Experimental Medicine; ORCID: 0000-0001-6121-7412, Researcher ID: D-8788-2013, Scopus Author ID: 6603948707

Sergey V. Lazarenko, PhD, associate professor of the Department of Urology; ORCID: 0000-0002-7200-4508, Researcher ID: Y-9451-2018

Alexander V. Ivanov, Prof, MD, PhD, Head of the Department of Histology, Embryology, Cytology; ORCID: 0000-0002-2412-0475, Researcher ID: G-1705-2013, Scopus Author ID: 57200084947

Dmitry A. Severinov, PhD, associate professor of the department of pediatric surgery and pediatrics, Institute of Continuing Education; ORCID: 0000-0003-4460-1353, Researcher ID: G-4584-2017, Scopus Author ID: 57192996740

Artem A. Denisov, assistant of the department of operative surgery and topographic anatomy; ORCID: 0000-0001-5034-8580, Scopus Author ID: 58161527100

Anastasia E. Kovaleva, student; ORCID: 0009-0008-4087-936X

Summary

* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal (p. VII–VIII).

Research Objective: To study the histological features of the reaction of liver tissue in an *in vivo* experiment when modeling various types of liver damage and using new samples of local hemostatic agents

Materials and methods. The research materials used were samples of new spongy polymer hemostatic agents (based on marine collagen, in different weight ratios with sodium salt of carboxymethylcellulose (three types of samples containing 15%, 25%, 50% collagen), as well as products used in clinical practice – hemostatic collagen sponge, Tachocomb collagen plate. The reaction of liver tissues to the use of these products in a chronic *in vivo* experiment was evaluated: rabbits underwent laparoscopic modeling of three variants of liver injury (tangential marginal resection of the right lobe, laceration of the middle lobe with a depth of 1.5 cm, superficial wound of the left lobe 1×1 cm), while hemostasis was performed by application or injection. In this case, hemostasis was performed by applying or injecting the tested products into the wound. The animals were taken out on the 28th day. Micro-preparations were manufactured, which were stained with hematoxylin and eosin, according to the Van Gieson method.

Results. A comparison of the histological picture of connective tissue in the area of experimental liver damage under conditions of use for hemostasis of different materials: hemostatic collagen sponge, Tachocomb hemostatic plate, as well as new samples shows that, regardless of the type of liver damage (wound in the thickness of the organ, marginal injury or superficial injury), a less pronounced tissue reaction and rapid Biodegradation shows the hemostatic collagen sponge material.

Conclusion. In comparison with a hemostatic collagen sponge, the use of a sample based on the sodium salt of carboxymethylcellulose with the addition of 15% collagen as a local remedy for stopping bleeding leads to a slowdown in the formation of connective tissue due to the “distraction” of macrophages to resorption of the remnants of the sodium salt of carboxymethylcellulose.

Keywords: liver injury, experiment, bleeding, local hemostatic agents, polymeric hemostatic agents, carboxymethylcellulose, collagen plate Tachocomb

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Среди всех случаев закрытого повреждения органов брюшной полости и забрюшинного пространства, как во взрослой, так и детской клинической практике значимую долю составляют травмы печени (до 48%). Повреждения печени в структуре повреждений находятся на втором месте (уступая лишь травме селезенки), однако, имеют большую летальность в виду массивных, трудно контролируемых кровотечений и развития печеночно-клеточной недостаточности у больных с тяжелой травмой печени [1–2]. Это может быть обусловлено сохраняющимся числом дорожно-транспортных происшествий, ростом доступного для населения травмоопасного транспорта (электросамокаты и т.д.), бытовыми травмами, повреждениями в ходе техногенных катастроф и военных операций [3]. Повреждения печени в 30–35% случаев требуют активной хирургической тактики, направленной на остановку кровотечения (во взрослой практике при нестабильной гемодинамике традиционным доступом является лапаротомия, в детской практике более вариабельные показания к оперативному лечению позволяют начать операцию с диагностической лапароскопии) [4, 5]. Также среди миниинвазивных методик гемостаза при обширной травме печени следует отметить эндоваскулярную эмболизацию ее сосудов, несмотря на множество плюсов методики она требует высокотехнологичного оборудования и специальной подготовки, в связи с чем доступна только в профильных краевых или федеральных учреждениях.

Одной из актуальных задач современной хирургии и биотехнологии является разработка новых местных кровоостанавливающих средств – МКС (губок, пленок, порошков, гелей и пр.) для эффективного интраоперационного гемостаза при повреждениях паренхиматозных органов (почки, селезенка, печень). Среди доступных хирургу методов интраоперационного гемостаза стоит отметить наложение гемостатических швов при обширных травмах паренхимы печени, оменто- и гепатопексию, а также использование МКС в качестве основного (аппликация на кровоточащую поверхность) и дополнительного (тампонирование раны перед ее ушиванием при глубоких ранениях) способа остановки кровотечения [6, 7]. В настоящее время, благодаря современным разработкам, сфера применения МКС постепенно расширяется, что позволяет применять МКС и при плановых и экстренных

лапароскопических вмешательствах на органах брюшной полости [8, 9]. К таким вариантам применения можно отнести эластичные губчатые структуры (в свернутом виде доставляемые через троакар в брюшную полость), гелевые композиции и порошкообразные средства со специальными устройствами доставки к зоне повреждения [10]. Известны изделия на основе коллагена, как отечественного (губка гемостатическая коллагеновая, ООО «Лужский завод «Белкозин», Россия), так и зарубежного производства (пластина коллагеновая Tachocomb, Takeda, Австрия). Также в клинической практике используются гемостатические средства на основе окисленной и восстановленной целлюлозы (Surgicel, Ethicon США). Важным преимуществом использования таких МКС является отсутствие необходимости в их дополнительной фиксации при паренхиматозных кровотечениях или размещении в глубоких ранах органа (путем тампонирования), а также их биодegradация (в течение 3–4 недель), что позволяет избежать повторных вмешательств, направленных на их удаление. Основным минусом применения МКС является малый спектр состояний, при которых они могут быть использованы в случае травмы печени. Данные средства эффективны как основной способ остановки кровотечения при обширных паренхиматозных кровотечениях (гемостаз достигается аппликацией на травмированную поверхность), и как дополнительный способ в случае использования в качестве амортизационной подложки при прошивании печени. Отдельно стоит отметить возможность тампонирования органа МКС и ушивания таких полостей, что используется крайне редко [11, 12, 13]. При этом критерием выбора МКС является не только его высокая эффективность (скорость остановки кровотечения), но и последующее воздействие на ткани органа (не должны вызывать дополнительного повреждения паренхимы в процессе деградации). Несмотря на это, в современной литературе по данному направлению представлено значительное количество разработок, подтверждающих необходимость поиска более совершенных МКС для эффективной остановки кровотечения при травмах паренхиматозных органов

Цель работы изучить гистологические особенности реакции ткани печени в эксперименте *in vivo* при моделировании различных вариантов повреждений печени и применении новых образцов местных кровоостанавливающих средств.

Материалы и методы

В качестве материалов исследования использовали образцы новых ГПКС – губчатых полимерных кровоостанавливающих средств («Губка кровоостанавливающая комбинированная», заявка на патент РФ № 2023123284 от 07.09.2023.). Характеристика ГПКС (группы исследования), а также используемых в клинической практике кровоостанавливающих средств (группы сравнения) представлены ниже (табл. 1) [14]. Количество групп исследования соответствует количеству используемых в эксперименте видов МКС.

Исследование выполняли в стерильных условиях операционного блока лаборатории экспериментальной хирургии и онкологии НИИ ЭМ КГМУ. Для обеспечения анестезиологического пособия использовался ингаляционный масочный наркоз (изофлюраном) с соблюдением международных и отечественных норм гуманного обращения с лабораторными животными: Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных,

Таблица 1.
Характеристика
исследуемых ма-
териалов и групп
сравнения
Table 1.
Characteristics of
the studied materi-
als and comparison
groups

№ группы	Название	Кол-во животных, n	Производитель	Состав
	Na-КМЦ+коллаген (85/15)	10	Лаборатория экспериментальной хирургии и онкологии НИИ ЭМ КГМУ, ООО «АС РС», г. Калининград, Россия	3% суспензия коллагена глубоководного кальмара, 1% гель натриевой соли карбоксиметиллцеллюлозы, Соотношение: коллаген/Na-КМЦ, равное в% масс. 15/85
	Na-КМЦ+коллаген (75/25)	10	Лаборатория экспериментальной хирургии и онкологии НИИ ЭМ КГМУ, ООО «АС РС», г. Калининград, Россия	3% суспензия коллагена глубоководного кальмара, 1% гель натриевой соли карбоксиметиллцеллюлозы, Соотношение: коллаген/Na-КМЦ, равное в% масс. 25/75
	Na-КМЦ+коллаген (50/50)	10		3% суспензия коллагена глубоководного кальмара, 1% гель натриевой соли карбоксиметиллцеллюлозы, Соотношение: коллаген/Na-КМЦ, равное в% масс. 50/50
	Губка коллагеновая гемостатическая (ГКГ)	10	ООО «Лужский завод «Белкозин», Россия	На 1 г: коллаген, субстанция – раствор 2% – 49 г (0,98 г сухого коллагена), нитрофуралин (фурацилин) – 0,0075 г, борная кислота – 0,0125 г
	Tachocomb	10	Takeda Austria GmbH, 4020 Linz, Austria	коллаген из сухожилий лошади; рибофлавин; лиофилизированный фибриноген человека; тромбин; аprotинин

используемых в научных целях, приказ Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и пр., а также под контролем регионального этического комитета при ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 16 ноября 2020 г.)

Животные (половозрелые кролики-самцы породы Советская Шиншилла, весом 3,5–4 кг) содержались в условиях экспериментально-биологической клиники КГМУ, где имели неограниченный доступ к корму и воде на всем протяжении эксперимента. В каждой группе исследования по 10 животных соответственно (каждому животному моделировали три варианты травмы печени, которые описаны ниже). В момент подготовки к операции все животные размещались на операционном столе в положении на спине с теплоизолирующей подкладкой.

Оперативное вмешательство выполняли лапароскопическим способом. Производили наложение карбоксиперитонеума иглой Veresh с предустановленными параметрами: давление 7 мм рт. ст., поток 1 л/мин. В брюшную полость устанавливали оптическую канюлю и 5-мм эндоскоп, затем последовательно – 2 троакара диаметром по 3 мм каждый для инструментов-манипуляторов в правой и левой мезогастральных областях. Моделирование травмы печени проводили тремя разными способами (рис. 1) в каждой группе эксперимента. Правую долю печени подвергали тангенциальной резекции, отсекая ткань по прямой линии, отступя 1 см от края. В средней доле тупым путем формировали полость посредством диссекции ее паренхимы разведением браншей зажима, введенного в толщу ткани и последующей его тракцией без смыкания браншей на глубину 1 см («Способ лапароскопического моделирования рваной раны печени у лабораторных животных для исследования гемостатических материалов», Евразийский патент на изобретение № 042177) [15].

На поверхности левой доли печени предварительно производили рассечение капсулы квадратной формы размерами 1 x 1 см с последующим иссечением намеченного лоскута с формированием поверхностного дефекта глубиной 0,3–0,5 мм. При этом для гемостатических целей торцевую раневую поверхность, образовавшуюся после иссечения края правой доли печени, укрывали ГПКС с использованием аппликации. В образованную в глубине средней доли печени полость вводили образец через раневую канал, сформированный манипулятором. Поверхностный дефект, воспроизведенный на левой доле печени, укрывали методом аппликации образца изучаемого средства (рис. 1). Во всех экспериментах в рану помещали образцы ГПКС одинаковых размеров 1 x 1 см без использования фиксационных и гемостатических швов. В каждом случае развивалось паренхиматозное кровотечение, которое было остановлено наложением/введением исследуемых средств, дополнительных методов остановки кровотечения (электрокоагуляции, гемостатических швов) не применялось.

В послеоперационном периоде антибактериальную терапию животным не проводили. Случаев прогнозируемой гибели животных не было. Выводили животных из эксперимента методом цервикальной дислокации на 28-е сутки после операции, проводили аутопсию с изъятием травмированных участков печени. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Заливку в парафин и микрофотографирование осуществляли по стандартным прописям. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также по методике Ван-Гизон. После выполнения микрофотографирования оценивали изменения тканей печени на различном увеличении: степень зрелости коллагеновых волокон; наличие и объем нерезорбированных остатков ГПКС; количество и размеры лимфо-гистиоцитарных инфильтратов вокруг ГПКС; выраженность и очаговость изменений гепатоцитов в печеночных дольках перипаневы зоны паренхимы печени

Результаты исследования

Модели травматической полости в толще средней доли печени

В группе с использованием образцов Na-КМЦ + коллаген 15% полость экспериментальной раны на 28-е сутки после моделирования травмы оказывается полностью заполнена соединительной тканью, состоящей в основном из зрелых коллагеновых волокон, степень зрелости которых убывает от периферии к центральной части области травматизации (рис. 2). Это объясняется тем, что единственным источником поступления макрофагов, участвующих в резорбции имплантированных материалов, является печень, поэтому в центральной части в силу их удаленности от паренхимы печени процессы резорбции имплантированных материалов отстают от периферии. Толщина соединительнотканной капсулы колеблется от 850–1215 мкм в области устья раневого канала и сужается к его дну. Синусоидные капилляры в прилегающих дольках печени расширены, признаков холестаза не отмечается. Тинкториальные свойства гепатоцитов равномерны по всех областях паренхимы, прилегающих к раневому каналу. В центральной части отмечаются участки скопления материала, инфильтрированные макрофагами, а также единичные скопления гепатоцитов без признаков интеграции с корнями желчевыводящих путей. Также отмечаются единичные лимфоцититарные инфильтраты, имеющие четкие границы и располагающиеся рядом с крупными скоплениями остатков Na-КМЦ/коллагена.

Микроскопическое исследование препаратов группы Na-КМЦ + коллаген 25% показало главное отличие от группы с применением ГПКС группы № 1 (Na-КМЦ + коллаген 15%) – наличие в устье раневого канала округлого образования с остатками ГПКС (рис. 3). Полость находится в мощной капсуле, образованной зрелыми коллагеновыми волокнами. В непосредственной близости к наружным слоям капсулы она имеет более рыхлое строение и между пучками коллагеновых волокон отчетливо различимы относительно небольшие скопления Na-КМЦ/коллагена. Устье раневого канала также заполнено скоплениями остатков ГПКС, разделенными прослойками плотной волокнистой соединительной ткани.

Таким образом, меньшая «зрелость» капсулы и ее клиновидная форма в области устья раневого канала могут объясняться большим (по сравнению с образцом № 1) содержанием коллагена в имплантированном комплексе Na-КМЦ/коллагена.

В устье раневого канала экспериментальных животных группы Na-КМЦ + коллаген 50% обнаруживаются округлые образования разных размеров и умеренно-плотной консистенции. При микроскопии препаратов в центре таких образований выявляется полость, стенки которой имеют толщину более 1000 мкм в любом участке

и представляют рыхлую сеть прослоек плотной волокнистой соединительной ткани. Зрелость и толщина коллагеновых волокон увеличивается в направлении от центра полости к периферии капсулы. От паренхимы печени капсула отделена выраженным зрелым слоем коллагеновых волокон. В толще капсулы имеются скопления остатков Na-КМЦ/коллагена. Наиболее крупные скопления на периферии капсулы окружены лейкоцитарными инфильтратами. В паренхиме печеночных долек, окружающих раневую канал, отчетливо видны очаговые изменения в центральных и промежуточных отделах долек в виде выраженной гидропической дистрофии. Учитывая описанные изменения, можно утверждать, что увеличение содержания коллагена в имплантируемом комплексе материалов до 50% приводит к усложнению и замедлению процессов резорбции ГПКС и замещению раневого дефекта и ГПКС плотной волокнистой соединительной тканью, а также – более выраженной реакцией ткани печени.

Исследование гистологических препаратов в группе ГКГ показало, что на всю глубину раневого канала распространяется соединительная ткань, толщина которой варьирует от 560 до 890–998 мкм, состоящая из зрелых коллагеновых волокон, ориентированных в основном вдоль оси раневого канала. Синусоидные капилляры в паренхиме печеночных долек печени, прилегающие к соединительнотканной структуре капсулы, расширены, что свидетельствует о ремоделировании соединительнотканной стромы органа вокруг области повреждения. При этом основу ее составляют клетки фибробластического дифферона, среди которых преобладают зрелые фибробласты. Новообразованные коллагеновые волокна имеют относительно небольшой диаметр и проявляют тенденцию к организации в пучки, вокруг очагов пролиферации фибробластов на месте подвергающихся резорбции фрагментов имплантированного материала волокна имеют циркулярную ориентацию. Анализ состояния изменений в области моделирования глубокой раны печени позволяет сделать вывод о завершении формирования соединительной ткани.

При изучении материала от животных 5-й группы (Tachosomb) в месте моделирования травмы определяется соединительная ткань с включениями фрагментов нерезорбированного ГПКС. Вокруг нее наблюдается слой с дисконкомплексированными печеночными балками, в различной степени расширенными синусоидными капиллярами. В периферическом отделе печеночных долек отмечается реакция купферовских клеток. Печеночная ткань содержит гепатоциты с выраженными признаками гидропической дистрофии (рис. 4).

Модель краевой раны правой доли печени

При оценке микропрепаратов в группе с использованием МКС Na-КМЦ + коллаген 15% установлено, что весь периметр раневой поверхности занят округлым образованием, которое представляет

собой множественные скопления Na-КМЦ/коллагена, разделенные соединительнотканными перегородками (рис. 5), состоящими из коллагеновых волокон. Снаружи эта структура также покрыта

относительно тонким слоем зрелых коллагеновых волокон. Остатки материала разделены на капли разного размера, в которые проникают лимфоциты и макрофаги. Скопления остатков ГПКС имеют разные размеры и различную степень инфильтрации лимфогистиоцитами.

При исследовании паренхимы печени установлено, что в зонах, прилегающих к ране, синусоидные капилляры расширены во всех локациях долек, гепатоциты с признаками гидропической дистрофии. Также встречаются лимфогистиоцитарные инфильтраты, как правило, имеющие четкие границы и находящиеся в области портальных трактов.

Все это позволяет сделать вывод, что репаративная регенерация при моделировании краевой раны по-разному протекает в глубине паренхимы печени и на ее поверхности. Непосредственный раневой канал заполнен сформировавшейся соединительной тканью, состоящей из зрелых коллагеновых волокон. А остатки ГПКС на поверхности раны оказываются покрыты соединительнотканной капсулой, образующей трабекулы, разделяющие остатки материала на фрагменты различного размера. Удаленность этого объема имплантированного материала от основного источника макрофагов приводит к относительно замедлению процессов резорбции импланта.

При исследовании микропрепаратов в группе Na-КМЦ + коллаген 25% лабораторных животных установлено, что, как и в случае с образцом № 1 (Na-КМЦ + коллаген 15%), раневая поверхность покрыта округлым образованием, состоящим из скоплений Na-КМЦ/коллагена, разделенных соединительнотканными перегородками. Поверхность также покрыта слоем тонких зрелых коллагеновых волокон, от паренхимы печени отделяется слоем более зрелых коллагеновых волокон толщиной от 420 до 670–720 мкм в различных участках. Центральную часть этого образования занимают скопления ГПКС. Имеются остатки Na-КМЦ/коллагена, находящиеся в окружении макрофагов и немногочисленные кистозные полости. Морфологическая картина в этой группе животных в сравнение с группой № 1 показывает, что увеличение концентрации коллагена замедляет скорость резорбции имплантированных материалов и их замещения зрелой рубцовой тканью. Сравнение морфологической картины группы Na-КМЦ + коллаген 50% в области экспериментальной краевой раны с таковой в № 2 группе эксперимента (Na-КМЦ + коллаген 25%) показывает, что соединительнотканная капсула вокруг ложа ГПКС имеет большую толщину и в нем обнаруживается больше остатков нерезорбированного материала. Скоплений Na-КМЦ/коллагена также больше, равно как и их размеры. Капсула полости отделена от паренхимы печени слоем более зрелых коллагеновых волокон. В прилежащих к соединительнотканной капсуле участках паренхимы печени наблюдается расширение синусоидных

капилляров и гидропическая дистрофия гепатоцитов, распространяющиеся на все отделы долек. В случае моделирования краевой раны, увеличение содержания коллагена в имплантируемом комплексе ГПКС приводит к усложнению и замедлению процессов резорбции имплантов и их замещения плотной волокнистой соединительной тканью.

При микроскопии гистологических препаратов в группе № 4 (ГКГ) обнаружено, что в области экспериментальной раны имеется сформированный соединительнотканый рубец, распространяющийся в паренхиму печени (рис. 6 А, Б). Коллагеновые волокна его интегрированы в соединительнотканную строму органа. Прослеживаются связи с соединительнотканными структурами, расположенными вокруг центральных вен ближайших к раневому каналу долек печени. При исследовании рубцовой ткани на больших увеличениях отчетливо видна её многослойная организация, в котором удаётся дифференцировать наружный – волокнисто-клеточный слой, средний – волокнистый слой и самый внутренний – клеточный.

Непосредственно под данной зоной на всем её протяжении отмечается слой паренхимы печени с проявлениями признаков гидропической дистрофии. Наружный слой рубца состоит из новообразованный тонких и средних коллагеновых волокон, между которыми обнаруживаются юные и зрелые фибробласты и единичные (в сравнении с количеством фибробластов) лейкоциты. В среднем слое клетки фибробластического дифферона представлены в основном зрелыми фибробластами и фиброцитами. На границе среднего (волокнистого) слоя и внутреннего (клеточного) слоя рубца встречаются локальные лимфогистиоцитарные инфильтраты. Самый внутренний слой представляет собой скопление пучков молодых коллагеновых волокон, ориентированных параллельно раневой поверхности печени и разделенных прослойками юных фибробластов. Таким образом, морфологическая картина на 28-е сутки после моделирования краевого дефекта печени с имплантацией ГКГ свидетельствует о продолжающемся ремоделировании рубца на фоне незначительной экссудации клеточных элементов, протекающей в основном в наиболее глубоком его слое.

Анализ препаратов печени после применения Tachosomb на модели краевой раны правой доли печени с помощью световой микроскопии (группа № 5) выявил разрастание фиброзной ткани в области экспериментального вмешательства и реакцию прилежащей паренхимы печени. Гепатоциты с явлениями гидропической дистрофии формируют балки, перемежающиеся расширенными синусоидными капиллярами. Центральные вены и печеночные триады не изменены. В области ближайших к зоне оперативного вмешательства портальных трактов отмечается умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация.

Модель поверхностной раны левой доли печени

Существенное отличие процессов регенерации печени от групп животных с моделированием «проникающих» ранений – отсутствие рубцовых изменений в паренхиме печени. Общее для всех

животных этой группы – покрытие всей площади экспериментального повреждения достаточно тонкой соединительной тканью умеренно эластичной консистенции. При микроскопии установлена

толщина ее от 870 до 1354 мкм (от периферии к центру раны). Она представляет собой неоднородную структуру, состоящую из крупных фрагментов, образованных остатками материала и отделенных друг от друга прослойками коллагеновых волокон в поверхностных слоях. По мере приближения к паренхиме размеры фрагментов уменьшаются, прослойки соединительной ткани между ними становятся толще. Непосредственно у поверхности паренхимы печени имеется относительно тонкий (около 100–150 мкм) слой плотной волокнистой соединительной ткани. Среди остатков ГПКС встречаются единичные некрупные лимфогистиоцитарные инфильтраты, в которых просматриваются немногочисленные мелкие фрагменты материала, подвергающиеся резорбции макрофагами. Среди коллагеновых волокон, разграничивающих скопления Na-КМЦ/коллагена, видны ядра многочисленных зрелых фибробластов.

В отличие от групп животных с моделированием внутреннего и краевого дефектов, в данной группе (Na-КМЦ + коллаген 25%) соединительная ткань сформирована по всей площади экспериментальной раны и представляет собой плотную волокнистую оформленную ткань (ПВСТ) с различной организацией. Слой соединительной ткани, непосредственно прилегающий к паренхиме печени, наиболее организован: состоит из зрелых коллагеновых волокон и клеток фибробластического ряда высокой степени дифференцировки (зрелые фибробласты и фиброциты). В поверхностных слоях плотность и степень зрелости волокон меньше, между волокон отмечаются скопления Na-КМЦ/коллагена веретеновидной формы, ориентированные вдоль направления хода волокон и находящиеся в финальной стадии резорбции. На отдельных участках обнаруживаются остатки нерезорбированного ГПКС. Во всех препаратах животных этой группы в паренхиме печени, прилегающей к ПВСТ, в гепатоцитах отмечаются признаки гидропической дистрофии, более выраженные рядом с ней и не проявляющие очагового характера в различных зонах печеночных долек.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что, в сравнении с ранее изученными образцами при моделировании поверхностной раны печени, введение в имплантированный комплекс 25% коллагена приводит к разделению формирующейся ткани на слои и более позднему ее «созреванию» в поверхностном слое, вероятно, из-за необходимости увеличения сроков миграции макрофагов из паренхимы печени в поверхностные слои ГПКС.

В отличие от группы животных № 2, (Na-КМЦ + коллаген 25%), в группе № 3 (Na-КМЦ + коллаген 50%) ПВСТ имеет значительно большую толщину

и существенно более неоднородную организацию. Самый глубокий слой ее образован с выраженным градиентом зрелости волокон в направлении «снаружи – внутрь». В более поверхностных слоях обнаруживаются остатки ГПКС в виде скопления Na-КМЦ/коллагена, окруженные лимфогистиоцитами, скопления которых разделены тонкими прослойками соединительной ткани.

Изучение препаратов группы ГКГ показало, что на всей площади имплантации имеется сформировавшийся соединительнотканый рубец, состоящий из тонких и средних коллагеновых волокон, преимущественно зрелых. Волокна его связаны с соединительнотканной стромой печени. Прилежащая область паренхимы печени разряжена на всем протяжении зоны модельной раны, оксифилия цитоплазмы гепатоцитов снижена. В области портальных трактов отмечается выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Следует отметить, что у части экспериментальных животных наблюдается инкорпорация гепатоцитов в рубец, где они образуют структуры, чем-то напоминающие печеночные балки, но без синусоидных капилляров, четкой пространственной организации, желчных проточков (холангиол). Формирование рубца в области моделирования поверхностной раны следует считать близким к совершенному. В сравнении с двумя другими способами моделирования повреждения печени, повреждения ее паренхимы наименее выражены, резорбция материала и замещение его коллагеновыми волокнами завершено.

При анализе гистологических препаратов печени животных, которым производилось моделирование поверхностной раны печени и аппликация пластины Tachocomb также, как и в других моделях определяется разрастание соединительной ткани в месте уже резорбированного материала. Прилежащие к нему участки паренхимы печени состоят из гепатоцитов с явлениями гидропической дистрофии. Выраженная дисконплексація не отмечается. Синусоидные капилляры умеренно расширены, без признаков полнокровия. Сосуды портальных трактов и центральные вены не изменены. В области портальных трактов отмечается незначительная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Капсула, сформированная вокруг фрагментов образца имеет двухслойное строение. Наружный слой состоит из более зрелых и упорядоченных коллагеновых волокон. Клеточный слой представлен клетками фибробластического дифферона различной степени зрелости, а также лимфоцитами. В клеточном слое капсулы имеющиеся коллагеновые волокна более тонкие, не имеют упорядоченной ориентации как в поверхностном слое.

Обсуждение результатов

Данная работа описывает опыт использования ГПКС на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, которые доказали высокую кровостанавливающую эффективность и биологическую инертность. Отличительной особенностью новых

образцов ГПКС является внесение в их состав коллагена морского происхождения, который по данным литературы обладает более низкими антигенными свойствами и вызывает менее интенсивную иммунную реакцию и воспаление. Механизм

кровоостанавливающего действия коллагена изучен достаточно, и считается, что коллаген запускает процессы коагуляции и образования сгустка крови. Согласно результатам собственных исследований, данное утверждение справедливо и в отношении коллагена глубоководного кальмара. Помимо этого, кровоостанавливающее действие коллагена потенцирует порозная структура Na-КМЦ, которая адсорбирует жидкий компонент крови, увеличивая концентрацию форменных элементов в зоне контакта травмированной поверхности и ГПКС. Сравнительный анализ изменений ткани печени в зоне имплантации ГПКС позволяет сделать вывод о том, что увеличение содержания коллагена в имплантируемом комплексе гемостатических материалов приводит к усложнению и замедлению процессов резорбции имплантов и их замещения ПВСТ. Такое же заключение можно сделать и в отношении второго компонента (Na-КМЦ) – вне его присутствия не связанный с гидрофильной полимерной массой коллаген резорбируется активнее. Сопоставление гистологической картины ткани в зоне экспериментального повреждения печени в условиях применения разных материалов: ГКГ, Tachosomb, а также образцы ГПКС из Na-КМЦ с добавлением 15%, 25% и 50% коллагена глубоководного кальмара показывает, что, вне зависимости от типа повреждения печени (рана в толще органа, краевое повреждение или поверхностное повреждение), менее выраженную тканевую реакцию и быстрые темпы биодеградации можно обнаружить при исследовании микропрепаратов группы ГКГ. Описанное утверждение основано на оценке следующих критериев: степень зрелости

коллагеновых волокон (отмечена по всей толщине рубца в месте размещения образцы); наличие и объем нерезорбированных остатков ГПКС; количество и размеры лимфогистиоцитарных инфильтратов вокруг ГПКС; выраженность и очаговость изменений гепатоцитов в печеночных дольках перипаневой зоны паренхимы печени.

Такие изменения могут быть обусловлены гомогенностью структуры ГКГ (отсутствие значительного количества добавок, в основе изделия – коллаген). В связи с этим, расщепление разработанных новых образцов ГПКС происходит медленнее ввиду «сложного» многокомпонентного состава (Na-КМЦ и морской коллаген в различных пропорциях). При этом описанные в ходе исследования изменения в тканях печени после моделирования травмы и имплантации разработанных изделий согласуются с опубликованными в открытых источниках данными. Так, Воронцов А.К. и соавт. описывают изменения в тканях печени крыс на 28-е экспериментальные сутки при размещении новых МКС, авторы обнаружили очаговую лимфогистиоцитарную инфильтрацию в зоне повреждения, пролиферацию молодых гепатоцитов на фоне зернистой дистрофии гепатоцитов, окружающих участок повреждения [8]. Ткаченко А.Н. и соавт. в собственных исследованиях МКС на основе неорганических солей на 28-е сутки после моделирования травмы печени кроликам (с последующим применением препарата «Алюфер»), отметили, что процесс репарации сопровождается уменьшением времени пролиферации и ускорением формированием сгустка (организовавшегося тромба), а также соединительной ткани с образованием неустойчивого рубца [9].

Заключение

Таким образом, в сравнении с ГКГ, применение в качестве локального гемостатика ГПКС на основе Na-КМЦ с добавлением 15% коллагена приводит к замедлению формирования соединительной ткани в зоне травматизации, вследствие «отвлечения» макрофагов на резорбцию остатков Na-КМЦ. В пользу этой гипотезы свидетельствует увеличение размерности оставшихся фрагментов материала по мере удаления от поверхности паренхимы печени, как основного источника клеток макрофагальной системы в области экспериментального повреждения. В целом же можно говорить о том,

что снижение массовой доли коллагена в структуре МКС (до уровня достаточного для эффективной остановки кровотечения), приводит к повышению биосовместимости конечного продукта. Это позволяет рассматривать данное направление (многокомпонентных полимерных губчатых кровоостанавливающих средств на основе солей КМЦ и коллагена глубоководного кальмара) как одно из перспективных в области разработки МКС и рекомендовать их для дальнейшего всестороннего тестирования в эксперименте с возможностью расширения сферы применения и вывода на рынок.

Источник финансирования.

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Этическая экспертиза.

Публикация работы выполнена под контролем этического комитета при ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, протокол № 3 регионального этического комитета от 16 ноября 2020 г.

Funding source.

The work was carried out in accordance with the scientific research plan of the Kursk State Medical University.

Ethics approval.

The publication of the work was carried out under the supervision of the Ethics Committee at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, protocol No. 3 of the regional Ethics Committee dated November 16, 2020.

Литература | References

- Evtikhov A.V., Lyubivyy E.D., Kim V.L. Treatment of severe liver trauma. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2020;(7):89–92. (In Russ.) doi: 10.17116/hirurgia202007189.
Евтихов А.В., Любивый Е.Д., Ким В.Л. Клинические наблюдения тяжелых травматических повреждений печени. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2020;7: 89–92. doi: 10.17116/hirurgia202007189.
- Parkhisenko Yu.A., Vorontsov A.K., Vorontsov K.E., et al. Analysis of the results of the surgical treatment of patients with trauma of the liver. *Perspectives of Science & Education*. 2018; 1(31): 245–250. (In Russ.)
Пархисенко Ю.А., Воронцов А.К., Воронцов К.Е., и др. Анализ результатов хирургического лечения пациентов с травматическими повреждениями печени. Перспективы науки и образования. 2018; 1(31): 245–250.
- Andreev A.A., Ostroushko A.P., Laptiyova A.Y., Glukhov A.A. Reparative liver regeneration after segmental resection (literature review). *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2018;5–6(18): 183–190. (In Russ.) doi: 10.17816/2072–2354.2018.18.3.183–190.
Андреев А.А., Остроушко А.П., Лаптиева А.Ю., Глухов А.А. Репаративная регенерация печени после сегментарной резекции (литературный обзор). Аспирантский вестник Поволжья. 2018;5–6(18): 183–190. doi: 10.17816/2072–2354.2018.18.3.183–190.
- Sung Y.K., Lee D.R., Chung D.J. Advances in the development of hemostatic biomaterials for medical application. *Biomaterials research*. 2021;1(25): s40824–021–00239–1. doi: 10.1186/s40824–021–00239–1.
- Gereng E.A., Vesir I.R., Kliushina T.S. Morphological and functional characteristics of liver regeneration when using the implant made of titanium nickelide (experimental study). *Crimean journal of experimental and clinical medicine*. 2020; 3(10): 12–15. (In Russ.) doi: 10.37279/2224–6444–2020–10–3–12–15.
Геренг Е.А., Весир И.Р., Ключина Т.С. Морфофункциональные особенности регенерации печени при использовании имплантата из никелида титана (экспериментальное исследование). Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2020; 3(10): 12–15. doi: 10.37279/2224–6444–2020–10–3–12–15.
- Zuk I.G., Lozhko P.M., Kudlo V.V. et al. Anatomical and experimental reasoning of liver resection by hydrodissection method. *Hepatology and Gastroenterology*. 2023;7(1):37–42. (In Russ.) doi: 10.25298/2616–5546–2023–7–1–37–42.
Жук И.Г., Ложко П.М., Кудло В.В. и др. Морфологическая характеристика раны печени при ее резекции с применением некоторых методов локального гемостаза в эксперименте. Гепатология и гастроэнтерология. 2023;1(7):37–42. doi: 10.25298/2616–5546–2023–7–1–37–42.
- Park Y.M., Seo H.I., Kim J.H. et al. Clinical application of a new hemostatic material using mussel-inspired catecholamine hemostat: A pilot study. *Annals of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2022;1(26):98–103. doi: 10.14701/ahbps.21–077.
- Vorontsov A.K., Troshin V.P., Parkhomenko Yu.A. et al. Features of recovery of liver cells after injury in an experimental study. *Modern problems of science and education*. 2020; 4:90–103. (In Russ.) doi: 10.17513/spno.29941.
Воронцов А.К., Трошин В.П., Пархисенко Ю.А. и др. Особенности регенерации клеток печени после травмы в экспериментальном исследовании. Современные проблемы науки и образования. 2020; 4: 90–103. doi: 10.17513/spno.29941.
- Tkachenko A.N., Savitskiy D.S., Khromov A.A. Experimental study of hemostasis at liver injuries. *Journal of experimental and clinical surgery*. 2021; 14(1): 47–52. (In Russ.) doi: 10.18499/2070–478X–2021–14–1–47–52.
Ткаченко А.Н., Савицкий Д.С., Хромов А.А. Экспериментальное изучение гемостаза при травмах печени. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2021; 14(1): 47–52. doi: 10.18499/2070–478X–2021–14–1–47–52.
- Laptiyova A. Yu., Andreev A.A., Glukhov A.A. et al. Intraoperative options to stimulate the reparative liver regeneration in the experiment. *Journal of experimental and clinical surgery*. 2023;4(16):294–302. (In Russ.) doi: 10.18499/2070–478X–2023–16–4–294–302.
Лаптиева А.Ю., Андреев А.А., Глухов А.А. и др. Интраоперационные способы стимуляции репаративной регенерации печени в эксперименте. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2023; 4(16):294–302. doi: 10.18499/2070–478X–2023–16–4–294–302.
- Simpson A., Shukla A., Brown A.C. Biomaterials for Hemostasis. *Annual review of biomedical engineering*. 2022;24:111–135. doi: 10.1146/annurev-bioeng-012521–101942.
- Huang L., Liu G.L., Kaye A.D. et al. Advances in topical hemostatic agent therapies: a comprehensive update. *Adv Ther*. 2020;37(10):4132–4148. doi: 10.1007/s12325–020–01467-y.
- Lipatov V.A., Lazarenko S.V., Severinov D.A. et al. Comparative analysis of efficacy of the new local hemostatic agents. *Extreme Medicine*. 2023; (4): 120–124. (In Russ.) doi: 10.47183/mes.2023.063.
Липатов В.А., Лазаренко С.В., Северинов Д.А. и др. Сравнительный анализ эффективности новых образцов местных гемостатических средств. Медицина экстремальных ситуаций. 2023;4:120–124. doi: 10.47183/mes.2023.063.
- Huang H., Chen H., Wang X. et al. Degradable and bioadhesive alginate-based composites: an effective hemostatic agent. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019;5(10):5498–5505. doi: 10.1021/acsbomaterials.9b01120.
- Hwang S., Na B.G., Kim M. et al. Rescue fibrin glue-infiltrating hemostasis combined with hepatorrhaphy to control intractable postoperative bleeding from the liver cut surface. *Annals of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2021;4(25):517–522. doi: 10.14701/ahbps.2021.25.4.517.

К статье

Исследование ткани печени при местном применении новых губчатых кровоостанавливающих средств в эксперименте (стр. 119–127)

To article

Study of liver tissue with topical application of new spongy hemostatic agents in experiment (p. 119–127)

Рисунок 1.

Варианты моделей травм печени: 1 – схематическое изображение размещения тестируемых образцов ГПКС в области моделированных травм печени: резекции правой доли (А), в толще средней доли (Б), на поверхности левой доли (В); 2 – интраоперационное фото, лапароскопия, тангенциальная резекция правой доли печени; 3 – интраоперационное фото, лапароскопия, рваная рана средней доли печени; 4 – интраоперационное фото, лапароскопия, поверхностная рана левой доли печени

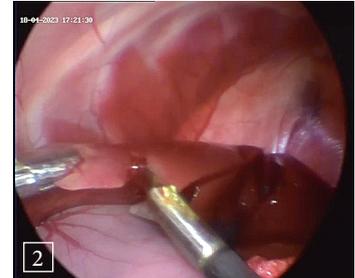
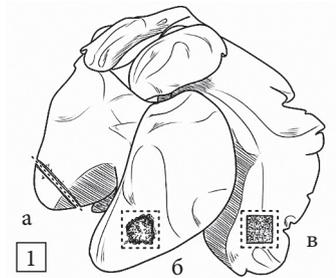


Figure 1.

Variants of liver injury models: 1 – schematic representation of the placement of the tested GPCC samples in the area of simulated liver injuries: resections of the right lobe (A), in the thickness of the middle lobe (B), on the surface of the left lobe (C); 2 – intraoperative photo, laparoscopy, tangential resection of the right lobe of the liver; 3 – intraoperative photo, laparoscopy, laceration of the middle lobe of the liver; 4 – intraoperative photo, laparoscopy, superficial wound of the left lobe of the liver

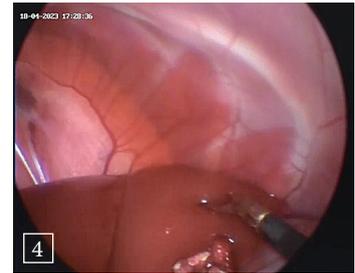
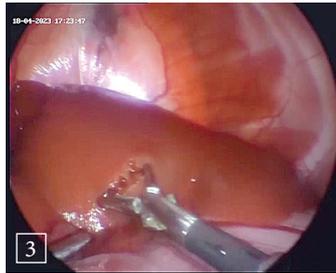


Рисунок 2.

Микрофото, 28-е сутки экспериментального исследования, моделирование травматической полости в толще средней доли печени и имплантации образца Na-КМЦ + коллаген 15%: А – окраска по Ван-Гизон, ув. $\times 200$; Б – окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 400$.

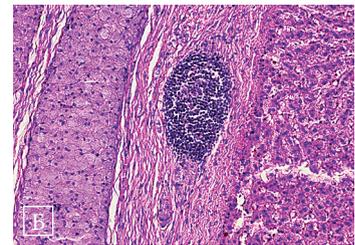
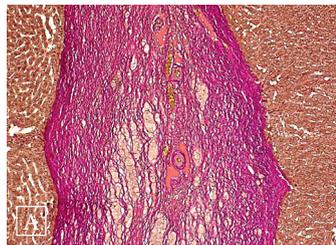


Figure 2.

Microfoto, day 28 of the experimental study, modeling of a traumatic cavity in the thickness of the middle lobe of the liver and implantation of a sample of Na-CMC + collagen 15%: A – Van Gieson stain, $\times 200$; B – hematoxylin-eosin stain, $\times 400$.

Рисунок 3.

Микрофото, 28-е сутки экспериментального исследования, моделирование травматической полости в толще средней доли печени и имплантации Na-КМЦ + коллаген 25%: А – окраска по Ван-Гизон, ув. $\times 40$; Б – окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 40$, полость указана красной стрелкой

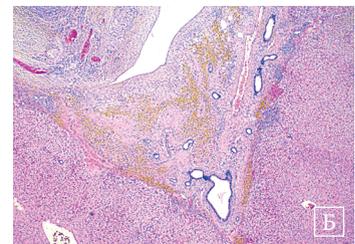
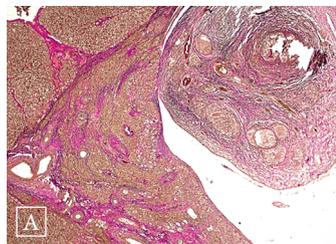


Figure 3.

Microfoto, day 28 of the experimental study, modeling of a traumatic cavity in the thickness of the middle lobe of the liver and implantation of Na-CMC + collagen 25%: A – Van Gieson stain, $\times 40$; B – hematoxylin-eosin stain, $\times 40$, the cavity is indicated by a red arrow

Рисунок 4.

Микрофото, 28-е сутки экспериментального исследования, моделирование раны в толще средней доли печени и имплантации Tachosomb, окраска гематоксилин-эозином: А – ув. $\times 100$, гепатоциты с признаками гидропической дистрофии отмечены стрелками; Б – ув. $\times 200$, зона лимфогистиоцитарного инфильтрата отмечена стрелкой

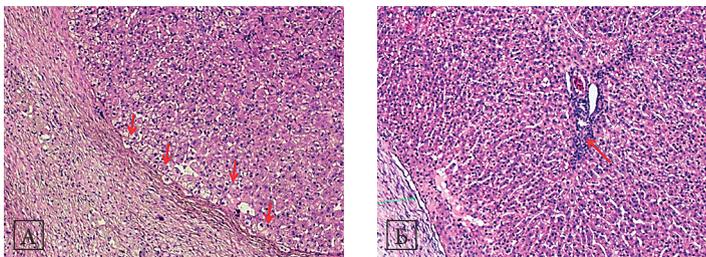


Figure 4.

Microfoto, day 28 of the experimental study, simulation of a wound in the thickness of the middle lobe of the liver and Tachosomb implantation, hematoxylin-eosin staining: A – $\times 100$, hepatocytes with signs of hydropic dystrophy are marked with arrows; B – $\times 200$, the zone of lymphohistiocytic infiltration is marked with an arrow

Рисунок 5.

Микрофото, 28-е сутки экспериментального исследования, моделирование краевой раны правой доли печени и аппликации образца Na-КМЦ + коллаген 15%: А) окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 40$; Б) окраска по Ван-Гизон, ув. $\times 40$

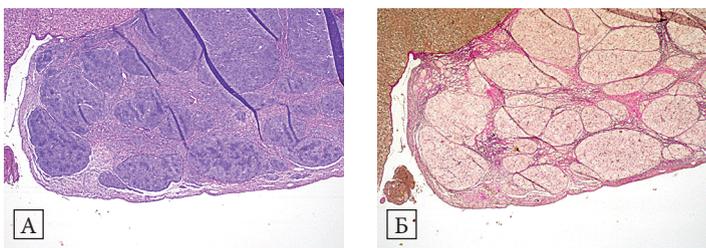


Figure 5.

Microfoto, day 28 of the experimental study, modeling of the marginal wound of the right lobe of the liver and application of a sample of Na-CMC + collagen 15%: A) hematoxylin-eosin staining, uv. $\times 40$; B) Van Gieson staining, $\times 40$

Рисунок 6.

Микрофото, 28-е сутки экспериментального исследования, моделирование краевой раны правой доли печени и имплантации ГКГ: А – окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 40$; Б – окраска по Ван-Гизон, ув. $\times 40$

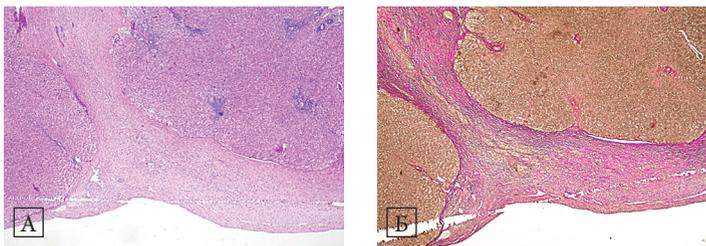


Figure 6.

Micrograph, day 28 of the experimental study, modeling of the marginal wound of the right lobe of the liver and application of a sample of Na-CMC + collagen 15%: A – hematoxylin-eosin staining, $\times 40$; B – Van Gieson staining, $\times 40$.