

na miękkim podkładzie i zalecono iniekcje Linco-spectin® (Upjohn). Pies zaczął chodzić używając protezy następnego dnia po operacji. Proteza była używana przez miesiąc, zanim doszło do destabilizacji. Protezę usunięto (RYS.1), a rana wygoiła się bez komplikacji.

Sześć tygodni później nowy trzpień został wprowadzony do jamy szpikowej kości piszczelowej. Operacja była podobna do opisanej powyżej. Trzpień pozostawał w kończynie 6 tygodni. Pies używał tej krótkiej protezy (RYS.2). Po tym czasie trzpień nadal był stabilny. Obwodowa część protezy dołączono w taki sposób jak przy poprzedniej operacji. Ta druga proteza była używana przez następny miesiąc i również uległa destabilizacji. Proteza została usunięta i rana wygojona.

Dyskusja

Do rozwiązania pozostają problemy mechaniczne i biomateriałowe. Pierwszy trzpień przebity drutami Kirschnera popękał w miejscu przewiercenia. Krótszy i grubszy następny trzpień nie popękał w tym miejscu lecz też uległ destabilizacji bez widocznego uszkodzenia. Trzpień powinien zostać zaprojektowany inaczej lub wykonany z innego biomateriału, zanim zakotwiczone w kości przebijające skórę protezy staną się użyteczne w chirurgii psów.

was used for one month until destabilisation of the stem occurred. The prosthesis was removed (FIG.1) and the wound healed without complications. Six weeks later a new stem was introduced into the tibial medullar cavity. The operation was similar as that described above. The stem was left in the limb for six weeks. The dog used this short artificial limb (FIG.2). After this time the stem was still stable. The distant part of the artificial limb was fixed as in the first operation. The second artificial limb was used for another month but it destabilised again. The prosthesis was removed and the wound healed.

Discussion

There are mechanical and biomaterial questions to be resolved. The first stem interlocked by Kirschner wires cracked at the point of interlocking. The next, shorter and thicker stem did not crack but it destabilised without any visible damage. Another design or material of the stem must be developed before the bone-anchored skin-penetrating limb prosthesis will be useful in canine surgery.

Piśmiennictwo

- [1]. Caberry C.A., Harvey H.J.: Owner Satisfaction With Limb Amputation in Dogs and Cats. J Am. Anim. Hosp. Assoc. 23; (1987), 227.
[2]. Crawley G.R., Grant B.D., Krpan M.K., Major M.D.: Long-term Follow-up Partial Limb Amputation in 13 Horses. Vet. Surg. 18, (1) (1989), 52-55

References

- [3]. Sterna J. Protezowanie kończyn tylnych u kozy domowej z użyciem biomateriałów węglowych. Opis przypadku. Biom. w med. i wet. Kraków 1997.

BADANIE WPŁYWU MATERIAŁÓW HEMOSTATYCZNYCH NA PARAMETRY UKŁADU KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZĘ

MARIA SZYMONOWICZ*, JAKUB KRATOCHWIL**,
ROMAN RUTOWSKI*, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ*,
DANUTA PALUCH*, LESZEK SOLSKI*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA*

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA
BIOMATERIAŁÓW KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

**OKRĘGOWY SZPITAL KOLEJOWY WE WROCŁAWIU

Streszczenie

W pracy przedstawiono ocenę wpływu wchłanianych materiałów hemostatycznych na układ krzepnięcia i fibrynolizę. W osoczu cytrynianowym ubogopłytkowym oznaczono wybrane parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy. Badania wykonano przed i po cza-

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF TOPICAL HAEMOSTATICS MATERIALS ON COAGULATION AND FIBRINOLYSIS PARAMETERS

MARIA SZYMONOWICZ*, JAKUB KRATOCHWIL**,
ROMAN RUTOWSKI*, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ*,
DANUTA PALUCH*, LESZEK SOLSKI*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA*

*INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS
RESEARCH, THE CHAIR AND CLINIC OF TRAUMATOLOGY AND HAND
SURGERY, MEDICAL ACADEMY, WROCLAW.

**DISTRICT RAILWAY HOSPITAL IN WROCLAW

Abstract

In this paper the influence of absorbable topical haemostatic materials on coagulation and fibrinolysis was evaluated. The parameters of coagulation and fibrinolysis were determined after a certain time of incubation in human citrated plasma. It has been stated

sowym kontakcie z materiałami hemostatycznymi. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że materiał Spongostan nie wpływa na aktywność białek układu krzepnięcia i fibrynolizy, natomiast materiał Surgicel powoduje ich inaktywację, a materiał TachoComb tworzy skrzep fibrynowy bez udziału osoczowych składników krzepnięcia.

Słowa kluczowe: materiały hemostatyczne, badania *in vitro* osocza, parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy

Wprowadzenie

Powodzenie każdego chirurgicznego zabiegu jest częściowo zależne od prawidłowego układu hemostazy. Jednak nawet sprawnie działający układ hemostazy może być niewystarczający dla zatrzymania utraty krwi bez mechanicznego zamknięcia uszkodzonych i krwawiących naczyń. Ucisk i podwiązywanie krwawiących naczyń jest zwykle czasowym opanowywaniem utraty krwi. Elektrokoagulacja i stosowanie laserów CO₂ dają korzyści i są wygodne w użyciu, powodują jednak termiczne uszkodzenie tkanek z następczą reakcją na ciało obce, która może prowadzić do opóźnienia gojenia się rany. Z tego powodu wprowadzono do użytku medycznego szereg środków do nieurazowego tamowania krwawienia, działających miejscowo hemostatycznie. Mają one tę zaletę, że ulegają wchłanianiu, które polega na ich powolnej degradacji i resorpcji poszczególnych fragmentów stosowanego materiału. W badaniach nad przydatnością materiałów hemostatycznych w zaopatrywaniu uszkodzonych i krwawiących ran z narządów mięsistych stwierdzono, że resorpcji najszybciej ulega Surgicel-14 dni następnie TachoComb-28 dni, najdłużej Spongostan-60 dni [1]. Zatrzymywanie krwawienia przez materiały hemostatyczne polega na mechanicznym ucisku powierzchni rany i na wytworzeniu rusztowania, na którym może dojść do tworzenia się i obkurczenia skrzepu. Materiał Spongostan z powodu swojej porowatej struktury posiada dużą zdolność wchłaniania krwi, co powoduje aktywację krwinek płytkowych i uczynienie układu krzepnięcia, następstwem czego jest powstanie skrzepu fibrynowego i zatrzymanie krwawienia.

Podobny mechanizm tamowania krwawienia zachodzi przy użyciu Surgicelu. Po nasyceniu krwią pęcznieje, stając się galaretowatą masą, która ułatwia tworzenie się skrzepu [2,3]. W przypadku kontaktu z raną materiału TachoComb następuje rozpuszczenie substancji pokrywających preparat. Ze składników materiału zostaje utworzony skrzep skierowany do światła rany, który jest wolniej rozkładany. Zaletą materiału jest hemostaza i klejenie tkanek [4]. Należy jednak podkreślić, że preparaty te są skuteczne jedynie wtedy, gdy nie ma odchylenia od stanu prawidłowego w układzie krzepnięcia. Podany proces przekształcania materiału, a z tym związane tworzenie skrzepu i tamowanie krwawienia, odnosi się do kontaktu z krwią.

W Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów AM we Wrocławiu podjęto badania wpływu materiałów hemostatycznych na płyn ustrojowy jakim jest osocze krwi.

Celem pracy jest ocena ilościowych parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza po czasowym kontakcie z wchłanialnymi materiałami hemostatycznymi w badaniach *in vitro*.

Materiał i metodyka

Do badań użyto: piankę żelatynową Spongostan Special oraz dzianą tkaninę z regenerowanej celulozy Surgicel- firmy Johnson & Johnson Medical Poland Sp. z o.o. jak

that Spongostan has no influence on the activity of proteins of coagulation and fibrinolysis, Surgicel deactivates them and TachoComb creates fibrin clot without plasma coagulation proteins.

Key words: topical haemostats, plasma *in vitro* tests, parameters of coagulation and fibrinolysis

Introduction

Success of every surgical procedure partially depends on patients coagulation system. Even efficient haemostasis may be not sufficient to stop bleeding without mechanical closing of the cut and bleeding vessels. There are many methods of controlling blood loss during the operation. We can mention packing, haemostatic sutures, electrocoagulation, and lasers. In the cases of profuse parenchymal bleeding the best results are achieved with absorbable topical haemostatic materials. Their advantage is that the second procedure to remove them from the operation field is unnecessary. According to the *in vivo* tests the shortest resorption time - 14 days - is observed with Surgicel, then - 28 days - with Tachocomb, and the longest - 60 days - with Spongostan [1].

Bleeding is stopped by haemostatic materials, by mechanical pressure on the surface and by producing scaffolding for the formation of clot. Spongostan with its porous structure shows high blood absorption with activation of platelets and clotting system resulting in the formation of fibrin clot and haemostasis. After soaking with blood Surgicel becomes a gelatinous mass which facilitates clotting and homeostasis [2,3]. The effect of TachoComb is quite different. In contact with blood, thrombin and fibrinogen contained in the superficial part of the material are released. Fibrinogen in presence of thrombin produces a fibrin cloth, which is protected by aprotinin [4].

The investigations carried out at the Experimental Surgery and Biomaterial Research Department have been undertaken to evaluate the influence of topical haemostats on human plasma.

The aim of this study was to determine quantitatively the changes of coagulation and fibrinolysis parameters in plasma after the contact with topical haemostats.

Material and methods

Tested materials were the following: gelatine sponge - Spongostan Special, woven cloth consisting of the oxidised regenerated cellulose - Surgicel, both produced by Johnson and Johnson Medical Poland and fibrin-glue-coated collagen fleece TachoComb produced by Hafslund Nycomed Ag, Austria.

The tests were conducted on human citrated plasma 0 Rh +, centrifuged in 1500g for 10 minutes. In sterile test tube 1.4 cc of plasma was contacted with 0.0098 g of the evaluated material and gently mixed. The contact time at room temperature was 5, 15, 30 and 60 minutes. Coagulation and fibrinolysis parameters were checked before and after the contact with the tested materials.

Several parameters were determined:

- APTT with Silimat (bioMerieux),
- prothrombin time (PT) and INR with Isimat (bioMerieux),
- thrombin time (TT) with Hemolab Trombicalci (bioMerieux),
- recalcination time (CT) [5]
- fibrinogen concentration (Fb) with Hemolab Firinomat (bioMerieux)
- coagulation inhibitors, screening test with correct plasma [5,6],
- soluble complexes of fibrin monomers (SCFM), paracoagulation Godal test [5],

i siateczkę z włókniiny kolagenowej pokrytej klejem fibrynowym TachoComb - firmy Hafslund Nycodem Ag Austria.

Doświadczenie wykonano na osoczu cytrynianowym otrzymanym z krwi ludzkiej grupy O Rh+ pobranej od dawców w proporcji 1:10 (1cz.objętości 0.11 mol/l cytrynianu trisodowego i 9 cz.objętości krwi) i wirowanej 1500g x 10 minut. Do jałowych probówek plastikowych z korkiem zawierających po 0.0098g ocenianego, materiału odmierzonego po 1.4 cm spulowanego, dokładnie wymieszanego ubogopłytkowego osocza cytrynianowego. Próby delikatnie mieszano ruchem wahadłowym. Czas kontaktu materiału z osoczem w temperaturze pokojowej wynosił 5, 15, 30, 60 minut. Osocze przed i po kontakcie z materiałami pobrano do badania układu krzepnięcia i fibrynolizy.

Oznaczono następujące parametry:

- czas kaolinowo-kefalinowy (APTT) zestawem Silimat firmy bioMerieux,
- czas protrombinowy (PT) i współczynnik protrombinowy (INR) zestawem Isimat firmy bioMerieux,
- czas trombinowy (TT) zestawem Hemolab Trombicalci firmy bioMerieux,
- czas rekalcynacji(CT) [5],
- stężenie fibrynogenu(Fb) zestawem Hemolab Fibrynomat firmy bioMerieux,
- inhibitory krzepnięcia, próba skryningowa z dodaniem osocza prawidłowego [5,6],
- obecność rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny(SCFM),test parakoagulacji Godala [5],
- fibrynolizę skrzepu frakcji euglobulin osocza (ELT)[6],
- obecność produktu degradacji fibryny, Dimeru-D (DD) testem lateksowym FDP-Slidex direct firmy bioMerieux.

Pomiary czasu krzepnięcia wykonano na koagulometrze Fibrintimer firmy Bering. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z użyciem programu Statystica 5.0, przyjmując poziom istotności $p < 0.05$.

Wyniki badań

Średnie wartości parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza przed (grupa kontrolna) i po kontakcie z materiałem Spongostan, Surgicel oraz TachoComb podano w TABELI 1.

Wartość APTT, PT i INR oraz TT i CT otrzymana dla osocza po 5,15,30 i 60 minutach kontaktu ze Spongostanem nie różniła się istotnie od średniej tych parametrów w grupie kontrolnej. Stężenia fibrynogenu w czasie obserwacji, było w zakresie wartości porównywalnych z grupą kontrolną. Skrzep frakcji euglobulin miał postać jednolitego, żelowego skrzepu, dla którego wartość ELT i WAF była na poziomie grupy kontrolnej. W procesie nieenzymatycznego krzepnięcia, ujemna próba Godala, stwierdzono zmętnienie osocza porównywalne z grupą kontrolną. Ujemna próba aglutacyjna, określona testem immunolateksowym, wskazuje na obecność w osoczu Dimeru-D na poziomie grupy kontrolnej.

Wartość APTT, TT i CT dla osocza po 5,15,30 i 60 minutach kontaktu z materiałem Surgicel była znacznie wydłużona, przekraczająca dla każdego parametru czas 200 s. Otrzymano 5.5-6.5 krotne przedłużenie APTT, 12.5-15.5 krotne przedłużenie TT oraz 1.5-2.5 krotne przedłużenie CT w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej. Wartość APTT i TT skorygowanego osocza po 5,15,30 i 60 minutach kontaktu z materiałem była wydłużona i istotnie różna w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej. Wartość PT(INR) po 5 minutach była istotnie wydłużona w porównaniu do grupy kontrolnej. Najwyższe wartości PT (INR), istotnie różne w stosunku do średniej w grupie kontrolnej, stwierdzono po 30 i 60 minutach. Wartość fibrynogenu po 5 minutach było porównywalne z wartością w grupie kontrolnej. Istotne zmniejszenie Fb stwierdzono po 15,

- fibrinolysis of euglobulin clot (ELT) and fibrinolytic activity indicator [6],

- fibrin degradation products, Dimer-D(DD) with the use of latex FDP test - Slidex direct (bioMerieux)

Clotting time was measured with Fibrintimer coagulometer (Bering). All data were analysed with Statystica 5.0 software, at $p < 0,05$.

Results

Mean values of plasma parameters before and after the contact with Spongostan, Surgicel and TachoComb are presented in TABLE 1.

Values of APTT, PT, INR, TT and CT after 5, 15, 30 and 60 min contact of plasma with Spongostan didn't differ from those of the control group. Fibrinogen concentration, negative Godal test, DD, ELT and WAF were similar to those of the control group.

APTT, TT and CT after 5, 15, 30 and 60 minutes of contact with Surgicel were significantly longer, each parameter exceeding 200 s. APTT was 5.5 - 6.5 times longer, TT was 12.5 - 15.5 times longer and CT was 1.5 - 2.5 times longer than the corresponding values of the control group. APTT and TT of the correct plasma after 5, 15, 30 and 60 minutes were longer and significantly different from the control group. PT and INR after 5 minutes were also significantly different from the control plasma. The value of PT (INR) after 30 and 60 minutes was the highest and significantly different from the mean of the control group. Fibrinogen concentration after 5 minutes was comparable to the control group but after 15, 30 and 60 minutes it was significantly lower. Observation of the clot didn't show its lysis during 480 minutes. The Godal test was negative and there was no agglutination during the latex test.

APTT and PT (INR) after the contact of TachoComb with plasma were comparable with the control group. TT after 5, 15, 30 and 60 minutes were significantly higher and CT significantly lower than the control group. Fibrinogen concentration after 30 minutes was similar to the control group but after 60 minutes it was significantly lower. Observation of ELT during 480 minutes revealed no lysis of the clot. The Godal test was positive; there was agglutination of the plasma after the contact with monoclonal antibodies.

Discussion

The experiments were conducted to evaluate quantitative changes of parameters of clotting and fibrinolytic systems after the contact with absorbable haemostatic materials. This estimation was made to determine and compare the activation of plasma coagulation and fibrinolytic components.

Activation of the intrinsic coagulation was estimated by APTT and CT and of the extrinsic coagulation by PT. Conversion of the fibrinogen to fibrin was tested by TT. Presence of the inhibitor in plasma was determined by the correction test and SCFM by Godal ethanol test. Activity of the fibrinolytic system was tested by lysis of euglobulin clot. Dimer-D was estimated by immunolateral test. The obtained data allowed for evaluating the influence of the tested materials on coagulation and fibrinolysis.

Spongostan because of its porous structure has great ability to absorb plasma (FIGS.1-3). Temporary contact of Spongostan with plasma doesn't change its pH and has no influence on parameters of coagulation and fibrinolysis. Gelatine sponge in direct contact with the low-platelet plasma doesn't activate proteins of clotting and fibrinolysis systems.

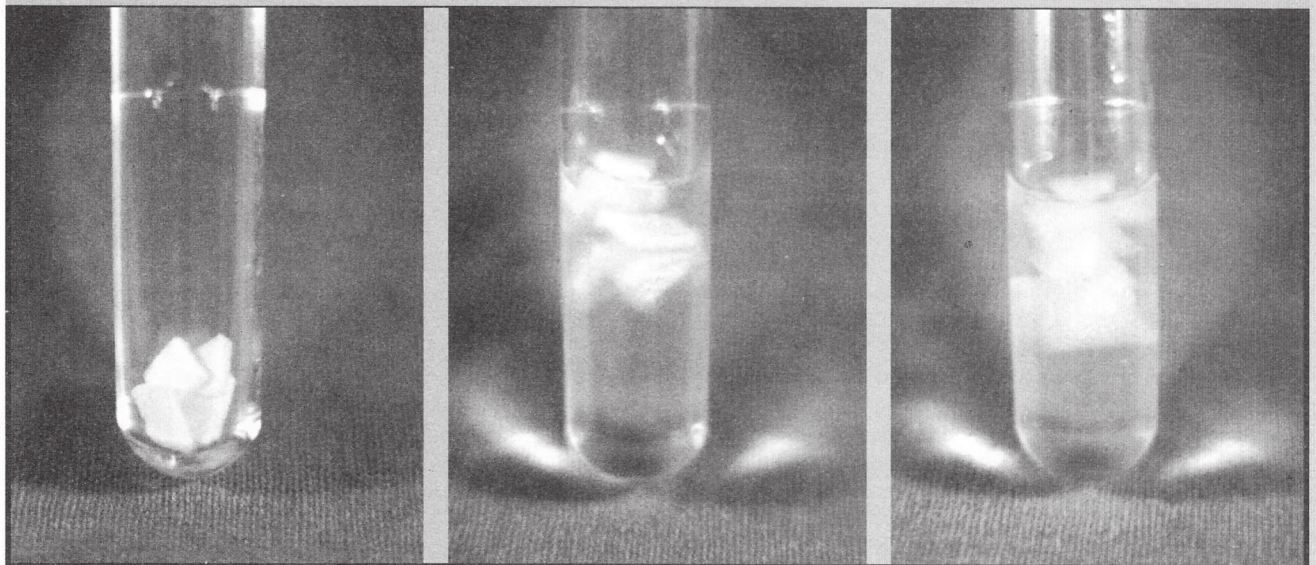
Material Material	Czas Time min.	APTT s	APTT kor s	PT		TT s	TT kor	CT	Fb g/l	ELT		Próba Godała Godal's test	Test lateksowy Latex test
				s	INR					min.	WAF		
Spongostan n=6	0	34,73 ± 0,72		10,85 ± 0,27	1,03 ± 0,07	16,13 ± 0,46		113,46 ± 7,44	2,93 ± 0,15	158,33 ± 9,31	1,82 ± 0,16	ujemna negative	ujemny negative
	5	34,45 ± 0,54		10,85 ± 0,21	0,98 ± 0,03	16,22 ± 0,17		110,72 ± 8,31	3,07 ± 0,08	159,16 ± 9,17	1,90 ± 0,10	ujemna negative	ujemny negative
	15	35,30 ± 0,49		11,06 ± 0,30	1,01 ± 0,03	16,26 ± 0,12		114,63 ± 5,12	2,93 ± 0,12	158,33 ± 9,31	1,86 ± 0,13	ujemna negative	ujemny negative
	30	34,98 ± 0,41		11,02 ± 0,17	1,01 ± 0,02	15,85 ± 0,21		115,23 ± 3,86	2,94 ± 0,09	160,0 ± 7,07	1,83 ± 0,11	ujemna negative	ujemny negative
	60	35,05 ± 0,34		10,98 ± 0,29	1,00 ± 0,03	16,06 ± 0,28		114,70 ± 4,53	2,86 ± 0,10	116,60 ± 10,65	1,77 ± 0,19	ujemna negative	ujemny negative
Surgicel n=6	0	36,56 ± 0,96	36,27 ± 1,25	12,73 ± 0,21	1,15 ± 0,02	16,25 ± 0,27	16,33 ± 0,31	109,05 ± 6,11	2,72 ± 0,07	161,66 ± 10,32	0,91 ± 0,10	ujemna negative	ujemny negative
	5	>200	53,73** ± 7,81	18,16*** ± 0,77	1,40*** ± 0,05	>200	22,70*** ± 0,47	>200	2,65 ± 10,0	skrzep clot	> 0,52 ± 0,02	ujemna negative	ujemny negative
	15	>200	54,77** ± 8,01	18,58*** ± 0,61	1,44*** ± 0,04	>200	25,93*** ± 1,01	>200	2,61* ± 0,08	skrzep clot	> 0,54 ± 0,02	ujemna negative	ujemny negative
	30	>200	57,50** ± 8,31	20,48*** ± 1,10	1,56*** ± 0,08	>200	27,27*** ± 0,88	>200	2,54* ± 0,15	skrzep clot	> 0,53 ± 0,03	ujemna negative	ujemny negative
	60	>200	58,53** ± 8,41	20,93*** ± 1,04	1,61*** ± 0,08	>200	28,50*** ± 0,69	>200	2,52** ± 0,11	skrzep clot	> 0,52 ± 0,02	ujemna negative	ujemny negative
TachoComb n=6	0	35,48 ± 0,62		10,80 ± 0,02	0,99 ± 0,01	16,06 ± 0,31		107,28 ± 8,59	2,76 ± 0,11	147,5 ± 6,12	1,87 ± 0,05	ujemna negative	ujemny negative
	5	35,52 ± 0,55		10,56 ± 0,21	0,98 ± 0,02	18,95*** ± 0,85		97,0* ± 1,46	2,74 ± 0,14	skrzep clot	> 0,57 ± 0,02	dodatnia positive	dodatni positive
	15	35,80 ± 0,62		10,53 0,22	0,97 ± 0,03	19,56*** ± 0,50		92,62* ± 4,39	2,72 ± 0,09	skrzep clot	> 0,55 ± 0,02	dodatnia positive	dodatni positive
	30	35,43 ± 0,60		10,60 ± 0,17	0,98 ± 0,01	19,98*** ± 0,56		86,82*** ± 5,0	2,66 ± 0,07	skrzep clot	> 0,55 ± 0,02	dodatnia positive	dodatni positive
	60	35,61 ± 0,61		10,65 ± 0,23	0,99 ± 0,03	20,25*** ± 0,68		85,38*** ± 3,69	2,63 ± 0,08	skrzep clot	> 0,55 ± 0,02	dodatnia positive	dodatni positive

TABELA 1. Wartości parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza kontrolnego (czas 0) i po kontakcie z materiałami hemostatycznymi.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej.

TABLE 1. Values of coagulation and fibrinolysis parameters for the plasma control group (time 0) and for the group after contact with hemostatic materials.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – differences of statistic importance in relation to the control group.



RYS. 1. Spongostan.

FIG. 1. Spongostan.

RYS. 2. Spongostan - po umieszczeniu w osoczu.

FIG. 2. Spongostan after contact with plasma.

RYS. 3. Spongostan - po 5 min.

FIG. 3. Spongostan - after 5 min.

30 jak i 60 minutach. Obserwacje czasu lizy skrzepu wykonywane do 480 minut wykazały, że nie ulega on w tym czasie upłynnieniu. Brak aglutynacji osocza stwierdzono w próbie lateksowej oraz brak żelowania w próbie Godała.

Wartość APTT i PT(INR) dla osocza po kontakcie z materiałem TachoComb we wszystkich czasach obserwacji nie różniła się istotnie od średniej w grupie kontrolnej.

Surgicel is made of the oxidised cellulose. After a short contact with plasma it degrades. During first 3 minutes it gradually changes to colloid at the surface of the plasma. During the enzymatic decomposition besides the colloidal form - zol - which transforms into gel, observed are single fibres of cellulose. This means that not all of the substance after the contact with plasma undergoes changes.

Wartość TT po 5 jak i 15, 30 oraz 60 minutach była istotnie wydłużona w porównaniu do grupy kontrolnej. Istotne skrócenie CT wystąpiło we wszystkich czasach obserwacji. Wartość fibrynogenu do 30 minut obserwacji było na poziomie wartości w grupie kontrolnej. Po 60 minutach zaobserwowano zmniejszenie stężenia Fb, istotne w odniesieniu do grupy kontrolnej. Obserwacje ELT wykonane do 480 minut wykazały, że skrzep euglobulin nie ulega lizie. W procesie nienenzymatycznego krzepnięcia stwierdzono żelowanie osocza, próba Godała dodatnia. Zaobserwowana aglutynację osocza w porównaniu do osocza kontrolnego, pod wpływem monoklonalnych przeciwciał.

Omówienie

Wykonane badania miały na celu prześledzenie ilościowych zmian parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza po kontakcie z materiałami hemostatycznymi. Ocena tych zmian posłużyła do określenia i porównania stopnia aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy przez badane materiały. Aktywację układu krzepnięcia w układzie wewnątrzpochodnym oceniono testem APTT i CT a w układzie zewnątrzpochodnym oceniono testem PT. Konwersję fibrynogenu w fibrynę określono testem TT. Obecność w osoczu inhibitora oceniono testem korekcyjnym, a występowanie rozpuszczalnych kompleksów SCFM oceniono testem parakoagulacyjnym (próba etanolowa Godała). Ocenę aktywności układu fibrynolitycznego wykonano poprzez badanie samoistnej lizy skrzepu frakcji euglobulin. Oznaczono również Dimer-D testem immunolateksowym. Uzyskane wyniki pozwoliły ocenić wpływ materiałów hemostatycznych na układ krzepnięcia i fibrynolizę.

Materiał Spongostan z powodu swojej porowatej porowatej struktury posiada dużą zdolność wchłaniania osocza (RYS. 1,2,3). Czasowy kontakt Spongostanu z osoczem nie zmienia jego wartości pH oraz nie wpływa na oznaczone parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy. Wartości pomiarowe czasów krzepnięcia osocza (APTT, PT, TT) po kontakcie ze Spongostanem są porównywalne z wartościami czasów osocza kontrolnego. Świadczy to o nieupośledzonym procesie krzepnięcia w układzie wewnątrz- i zewnątrzpochodnym.

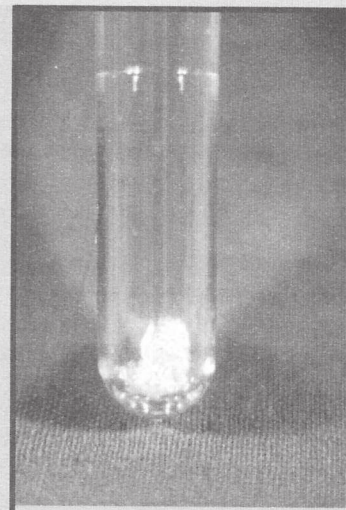
Surgicel jest preparatem występującym w postaci jałowych płatów tkaniny. Jako materiał jest kopolimerem glukozy otrzymanym przez utlenianie glukozy. Po umieszczeniu w osoczu szybko go chłonie i ulega degradacji. Stopniowo przekształca się z postaci stałej w postać koloidową, umiejscawiając się przy powierzchni osocza. Proces trwa do 3 minut. Przemiany te są wynikiem obecności w osoczu enzymów, które powodują rozpad i enzymatyczną depolimeryzację materiału. W czasie enzymatycznej modyfikacji materiału w osoczu, oprócz jego koloidowej postaci - zolu, która przechodzi po zastygnięciu w postać sztywną - żel, stwierdzono pojedyncze włókna celulozy. Świadczy to o tym, że nie cała ilość materiału weszła w reakcję z osoczem dając nową postać (RYS. 4,5,6,7,8). Obecność materiału w osoczu i jego rozpad, przyczynił się do zmniejszenia wartości pH osocza z 7,4-7,8 do pH 6,0-6,5. Zmniejszenie wartości pH było prawdopodobnie jednym z czynników przyspieszających proces żelowania materiału. Oceniając układ krzepnięcia osocza ubogopłytkowego po czasowym jego kontakcie materiałem Surgicel, stwierdzono wyraźne wydłużenie APTT, TT jak również PT.

Obserwowano zmniejszenie stężenia fibrynogenu. Utworzony skrzep euglobulin osocza nie uległ lizie w przewidzianym czasie badania. W osoczu nie stwierdzono zwiększonej ilości rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (test Godała, ujemny) oraz produktu degradacji fibryny, Dimeru-D (ujemny test lateksowy). Zaobserwowane wydłużenie czasów może sugerować o tym, że w wyniku kon-

The presence of Surgicel in plasma and its decomposition decrease the pH value from 7.4 - 7.8 to 6.0 - 6.5 which is probably the reason for the accelerated transformation of zol to gel (FIGS. 4 - 8). The observed change of the coagulation parameters may suggest that the contact of Surgicel

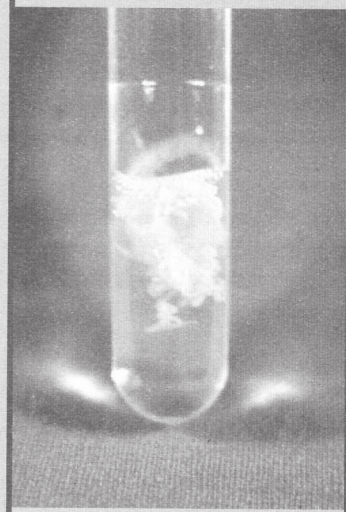
RYS. 4. Surgicel.

FIG. 4. Surgicel.



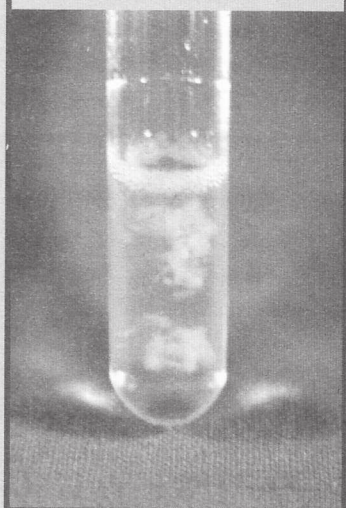
RYS. 5. Surgicel - po umieszczeniu w osoczu.

FIG. 5. Surgicel - after contact with plasma.



RYS. 6. Surgicel - znaczna degradacja i sedymentacja po 1 min.

FIG. 6. Surgicel - degradation and sedimentation after 1 min.



with plasma brings about quantitative deficit of clotting components caused by hindered transformation of their inactive form to the active form or by the presence of inhibitors. After the correction test it can be stated that the observed effects are connected with the presence of an inhibitor in the plasma [5,7,8,9]. Activity of the plasma coagulation components is related to the pH value. The low pH value could cause deactivation of proteins and decrease their biological activity [10].

The clot of euglobulin was different from that of the control plasma. It contained packed mass inside. The clot was not

taktu materiału z osoczem nastąpił ilościowy niedobór czynników krzepnięcia, jak również o tym, że aktywacja nieczynnego czynnika do formy czynnej została zahamowana lub, gdy na aktywny czynnik zadziałał inhibitor. W celu wyjaśnienia przyczyny wydłużenia czasów: APTT, TT, CT wykonano test korekcyjny, polegający na oznaczeniu APTT i TT w mieszaninie osocza 1:1 badanego i prawidłowego. W przypadku, gdyby w mieszaninie osocza nastąpiła normalizacja czasu krzepnięcia do wartości obserwowanej w kontrolnym osoczu, można wtedy stwierdzić, że przedłużenie czasu jest wywołane niedoborem czynników krzepnięcia. Otrzymany w osoczu skorygowym wydłużony APTT świadczy o obecności w badanym osoczu inhibitora krzepnięcia [5,7,8,9].

Na aktywność białek układu krzepnięcia oprócz składu materiału również miała wpływ zmniejszona wartość pH osocza. Zmniejszenie wartości pH osocza mogło przyczynić się do inaktywacji białek, obniżenie ich własności biologicznych. Stwierdzone zmniejszenie stężenia fibrynogenu nie ma znaczenia diagnostycznego, ponieważ mieści się w zakresie wartości prawidłowych dla osocza kontrolnego wynoszących od 2-5 g/l [10].

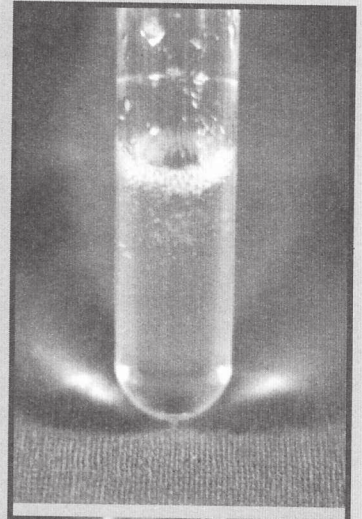
Żelowy skrzep euglobulin różnił się od skrzepu uzyskanego z osocza kontrolnego. W centralnej jego części widoczna była zbita masa. Skrzep ten nie uległ fibrynolizie w zakresie wartości od 150 minut do 360 minut, wartości objętych normą [6]. Związane jest to z reakcjami zachodzącymi podczas procesu wytrącania frakcji euglobulin z osocza. Pod wpływem jonów Ca centrum skrzepu zostało utworzone z wykrzepionych włókien celulozy, które pozostały w osoczu po degradacji i przekształceniu materiału. Włókna te najprawdopodobniej inaktywują plazminę, enzym fibrynolizy obecny w osadzie euglobulin, nie doprowadzając do jego fibrynolizy.

TachoComb jest preparatem hemostatycznym występującym w postaci jałowej siateczki składającej z włókniny kolagenowej pokrytej klejem fibrynowym ze składnikami przyspieszającymi koagulację. W czasie kontaktu materiału TachoComb z osoczem, obserwowano zmianę jego postaci. Warstwa kolagenowa pęczniała, a z warstwy kleju fibrynowego w wyniku rozpuszczenia i reakcji enzymatycznej został utworzony żelowy skrzep. Proces trwał do 5 minut (RYS.9,10,11).

fibrinolysed after 150 - 360 minutes [6]. This is connected with reactions taking place during the precipitation of euglobulin from plasma. Under the influence of Ca^{2+} ions the clot centre was formed by cellulose fibres that remain in plasma after the degradation of Surgicel. These fibres probably deactivate plasmin and stop fibrinolysis. TachoComb is a sterile collagen fleece covered with a fibrin glue with some components accelerating coagulation of blood. In contact with blood TachoComb changed its form.

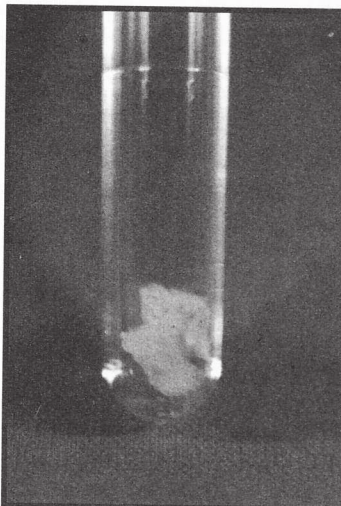
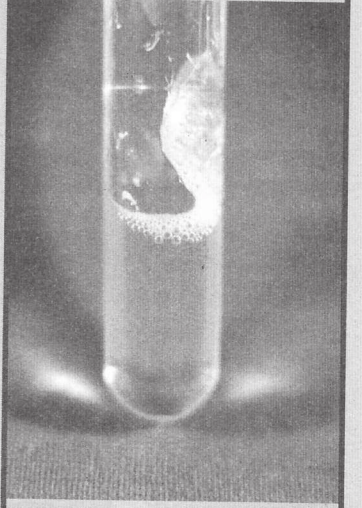
RYS. 7. Surgicel – widoczna postać koloidowa przy powierzchni osocza po 5 min.

FIG. 7. Surgicel – colloidal form visible on the border of the plasma surface after 5 min.



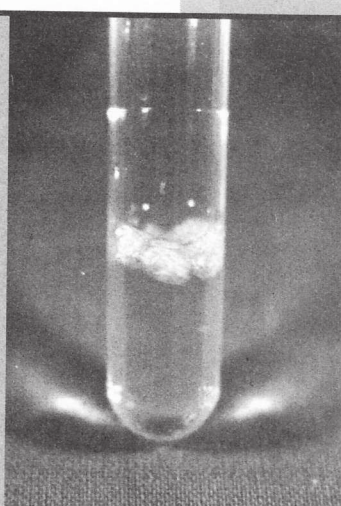
RYS. 8. Surgicel – postać żelowa po 5 min.

FIG. 8. Surgicel – gel form after 5 min.



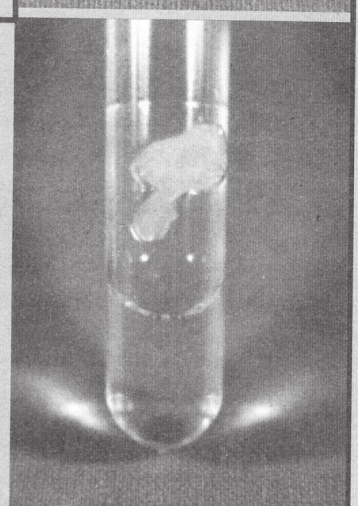
RYS. 9. TachoComb.

FIG. 9. TachoComb.



RYS. 10. TachoComb – po umieszczeniu w osoczu.

FIG. 10. TachoComb – after contact with plasma .



RYS.11. TachoComb – usunięty z osocza razem ze skrzepem fibrynowym.

FIG. 11. TachoComb – removed from the plasma with the fibrinous clot after 5 min.

Oceniając układ krzepnięcia, stwierdzono prawidłowy APTT i PT, świadczy to o nie zmienionej aktywności składników osocza w zewnątrz- i wewnątrzpocho-dnym układzie krzepnięcia. Zmiany w wartościach czasu wapniowego- skrócony CT nie mają znaczenia diagnostycznego i mogą sugerować o nieznacznej aktywacji składników w układzie zewnątrzpocho-dnym, bez ich zużycia. Dodatni test Godala, świadczy o zwiększonej ilości w osoczu rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (SCFM). Wykazany dodatni test lateksowy wskazuje na obecność w osoczu produktu degradacji fibryny stabilizowanej, Dimeru-D w stężeniu przekraczającym próg czułości próby (500 $\mu\text{g/ml}$) [11]. Zmniejszenie stężenia fibrynogenu w osoczu przy dłuższym kontakcie z opatoczkami może być wynikiem działania na niego trombiny pochodzącej z materiału jak również tworzeniem kompleksów z monomerami fibryny. Zmniejszenie stężenia nie ma znaczenia diagnostycznego, ponieważ mieści się w zakresie wartości objętych normą [10]. Zaobserwowane wydłużenie TT przy prawidłowym stężeniu fibrynogenu, może być związane z unieczynnieniem trombiny przez obecne w osoczu kompleksy rozpuszczalne monomerów fibryny głównie FDP. Produkty rozpadu fibrynogenu - FDP powstały pod wpływem działania enzymu plazminy na fibrynogen, ale nie osoczowy, lecz pochodzący z warstwy kleju fibrynowego materiału [11].

W czasie kontaktu z osoczem delikatna struktura, a szczególnie warstwa kleju fibrynowego ulegała naruszeniu, degradacji i sedymentacji do płynu. W ten sposób fibrynogen z materiału stał się produktem dla enzymu fibrynolizy, plazminy.

Wytrącony żelowy skrzep frakcji euglobulin osocza różnił się od skrzepu powstałego z osocza kontrolnego. W centralnej części skrzepu była zbita masa. Skrzep ten nie ulegał upłynnieniu. W czasie procesu wytrącania skrzepu frakcji euglobulin, monomery fibryny obecne w osoczu z udziałem jonów Ca^{2+} i czynnika XIII, tworzą skrzep fibrynowy, stanowiąc jego centrum. Stabilizowana fibryna została otoczona warstwą euglobulinową, w której stwierdzono pierzastą postać spolimeryzowanej fibryny tworzącą jakby rusztowanie, które prawdopodobnie zabezpiecza przed upłynnieniem całego skrzepu. W warstwie euglobulinowej oprócz osoczowych składników w tym i plazminy przypuszczalnie występuje aprotynina, pochodząca ze składu materiału.

Aprotynina opóźnia dezintegrację przez plazminę skrzepu euglobulin, oraz utworzonego skrzepu fibrynowego przy powierzchni materiału.

Reasumując, można stwierdzić, że materiał Spongostan nie wpływa na ilościowe zmiany parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy. Zmiana stanu skupienia materiału Surgicel wpływa na układ krzepnięcia osocza. Proces jest złożony. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że w osoczu w wyniku kontaktu z materiałem Surgicel, dochodzi do zatrzymania procesu krzepnięcia. Związane to jest przypuszczalnie z procesem zahamowania aktywacji czynników krzepnięcia lub działaniem na aktywny czynnik inhibitora. Takie mechanizmy są uruchamiane przez heparynę i tak może działać materiał Surgicel w kontakcie z osoczem. W czasie kontaktu osocza z materiałem TachoComb, warstwa kolagenowa materiału pęczniała a w warstwie kleju fibrynowego, w wyniku działania na nią enzymów proteolitycznych osocza, nastąpił rozpad peptydów fibrynowych a pod wpływem trombiny przekształcenie fibrynogenu w monomery fibryny. Monomery fibryny w obecności składników przyspieszających krzepnięcie utworzyły pod warstwą kolagenową skrzep fibrynowy. Uzyskane wyniki potwierdzają, że skrzep powstał ze składników materiału. Stwierdzony w osoczu zwiększony poziom rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny świadczy o tym, że w wyniku działania trombiny na fibrynogen w materiale nie cała ilość monomerów fibryny spolimeryzowała w skrzep, część z nich weszła

The layer of collagen swelled and that of fibrin glue dissolved and produced a fibrin clot. The overall process took 5 minutes (Figs. 9-11).

The correct APTT and PT indicate normal activity of the intrinsic and extrinsic clotting system. Changes of CT have no diagnostic importance and may suggest slight activation of the extrinsic coagulation system without consumption of plasma components. Positive Godal test shows an increased amount of SCFM. Positive latex test proves that the concentration of Dimer-D, the degradation product of stabilised FDP is higher than 500 $\mu\text{g/ml}$ [11].

Decreased level of fibrinogen in plasma after a longer contact with TachoComb may result from the activity of thrombin from the dressing and from the formation of complexes with fibrin monomers. The observed lowering of fibrinogen concentration is not significant because it falls in the acceptable normal range [10]. Elongation of TT with normal fibrinogen concentration may be connected with deactivation of thrombin by complexes of fibrin monomers dissolved in plasma, mainly FDP. FDP are produced in a reaction between plasmin and fibrinogen - not coming from plasma but from the layer of fibrin glue of TachoComb [11]. In contact with plasma the delicate structure of Tachocomb and especially its fibrin glue layer, changes, dissolves and comes to plasma. In this way fibrinogen from haemostat becomes a product for the fibrinolytic enzyme - plasmin.

The clot of euglobulins differs from that of the control plasma. It contained condensed mass in its central part and was not soluble. During the process of clotting, fibrin monomers from plasma together with Ca^{2+} ions and factor XIII formed fibrin clot. Stabilised fibrin was covered with a layer of euglobulin in which there was a feather-like form of polymerised fibrin constituting sort of scaffolding that probably prevented complete dissolution of the clot. In the layer of euglobulin, beside plasma components, there was probably aprotynin from the material. Aprotynin delayed disintegration of the euglobulin clot and the fibrin clot at the surface of TachoComb.

To resume data from the in vitro tests it can be stated that Spongostan in contact with low-platelet plasma does not influence the parameters of coagulation and fibrinolysis. When Surgicel is in contact with plasma the clotting components of plasma are not consumed but the clotting process is stopped, probably due to hindered activation of plasma components or inhibitor effect on active components. Similar mechanisms are activated by heparin. TachoComb in contact with plasma produces fibrin clot that comes from the layer of fibrin glue. Plasma components do not take part in this process. Activation of clotting is stronger than fibrinolysis because of aprotynin that deactivates plasmin - the fibrinolytic enzyme.

Conclusions

1. Spongostan in contact with the low-platelet plasma does not change the activity of proteins of clotting and fibrinolysis.

2. Surgicel in contact with the low-platelet plasma undergoes immediate changes and deactivates plasma components that affect the parameters of coagulation and haemostasis. It acts as a clotting inhibitor.

3. TachoComb in contact with the low-platelet plasma produces a clot on its surface without the participation of plasma components. The clot is stabilised by aprotynin that inhibits plasmin.

w skład kompleksów w osoczu. Procesowi tworzenia się skrzepu fibrynowego, czyli aktywacji krzepnięcia, przeciwdziała proces upłynniania skrzepu, czyli aktywacja fibrynolizy. Aktywacja układu krzepnięcia jest silniejsza w wyniku obecności aprotyniny, inaktywatora plazminy, która zwiększa stabilność fibrynolizy.

Wnioski

1. Spongostan w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym nie wpływa na zmianę aktywności białek układu krzepnięcia i układu fibrynolitycznego.
2. Surgicel w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym ulega natychmiastowej degradacji i inaktywuje składniki osocza, co wywołuje ilościowe zmiany parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy. Działając jako inhibitor wykazuje w ten sposób właściwości antykoagulacyjne.
3. TachoComb w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym tworzy przy swojej powierzchni skrzep, bez udziału osoczowych składników. Skład materiału spowodował zwiększenie poziomu kompleksów SCFM i Dimeru-D, a obecność aprotyniny przeciwdziała szybkiemu upłynnianiu skrzepu.

BADANIA BIOLOGICZNE WŁÓKIEN Z DIBUTYRYLOCHITYNY

DANUTA PALUCH*, LIDIA SZOSLAND**, JERZY KOŁODZIEJ*,
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ*,
MARIA SZYMONOWICZ*, LESZEK SOLSKI*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA*

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ I CHIRURGII RĘKI AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

**KATEDRA CHEMII FIZYCZNEJ POLIMERÓW
POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ W ŁODZI

Streszczenie

Opracowana w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów metoda otrzymywania dibutyrylochityny przy użyciu kwasu nadchlorowego jako katalizatora reakcji estryfikacji chityny posiada szereg zalet: jest prosta, szybka i daje powtarzalne wyniki. Metoda ta powoduje znaczną degradację chityny, jednak nadal można otrzymać produkty reakcji o dostatecznie wysokiej masie cząsteczkowej o własnościach błono- i włóknotwórczych. Szereg doskonałych własności dibutyrylochityny, takich jak dobra rozpuszczalność w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność, odporność na gamma radiację, zdolność tworzenia błon, mikrosfer i włókien czynią z niej polimer o dużych możliwościach w ewentualnym stosowaniu do celów biomedycznych.

Piśmiennictwo

References

- [1] Staniszevska-Kuś J., Rutowski R., Kratochwil J., Paluch D., Szymonowicz M. Solski L. Żywicka B. Badania porównawcze materiałów do śródoperacyjnej hemostazy, Inżynieria Biomateriałów 1, 3, (1998), 17-20.
- [2] Wagner W.R. i wsp.: Comparative in vitro analysis hemostatic agents, J.Surg.Res.66(1996) 100-108.
- [3] Coln D., Horton J., Ogieden M.E. and Buja L.M. Evaluation of hemostatic agents in experimental splenic lacerations. Am. J.Surg. 145, (1983), 256-261.
- [4] Agus G. B., Bono. A. V., Olivero S., Peilowich A. Et. Al.: Hemostatic efficacy and safety of Tachocomb in surgery. Ready to use and rapid hemostatic agent. Int. Surg. 81, 3, (1996), 316-319.
- [5] Bomski H.: Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 15-16, (1995), 226-309.
- [6] Pawelski S.: Diagnostyka laboratoryjna w hematologii. PZWL Warszawa 1990, 193-258.
- [7] Rodak B. Diagnostik Hematology. Chapman and Hall, Philadelphia 1995.
- [8] Kasper C.K., Ewing N. P.: Acquired inhibitors of plasma coagulation factors. J. Med. Tech. 3, (1986), 431-436.
- [9] Casu B.: Structure and biological activity of heparin, Adv.Carb.Chem. Biochem.43, (1985), 51-134.
- [10] Sawicka B.: Fibrynogen- wartość diagnostyczna wyników oznaczeń, Diagn.Lab., 34, 4, (1998), 587-595.
- [11] Jastrzębska M.: Znaczenie D-Dmerów w diagnostyce zaburzeń hemostazy. BioMerieux, sp.z.o.o.1998, 3-18.

A BIOLOGICAL INVESTIGATION OF DIBUTYRYLCHITIN FIBRES

DANUTA PALUCH*, LIDIA SZOSLAND**, JERZY KOŁODZIEJ*,
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ*,
MARIA SZYMONOWICZ*, LESZEK SOLSKI*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA*

*INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, THE CHAIR AND CLINIC OF TRAUMATOLOGY AND HAND SURGERY, MEDICAL ACADEMY, WROCLAW.

** DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY OF POLYMERS,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,

Abstract

The procedure of preparation of dibutyrylchitin using perchloric acid as a cheap and easily available catalyst of chitin esterification, evaluated at the Division of Physical Chemistry of Polymers, has a number of advantages: it is simple, quick and reproducible. This method promotes significant degradation of chitin. However, it is possible to synthesise a polymer with a molecular mass high enough to form strong films, fibres or microspheres. Butyrylation of chitin gives a high yield of easily soluble products with a degree of substitution ca 2. Excellent properties of dibutyrylchitin such as easy solubility in common organic solvents, bioactivity, resistance to gamma irradiation, ability to form films, fibres and microspheres enable its wide application in medicine. The main target of our investigation was to evaluate the biocompatibility of