

BADANIA PORÓWNAWCZE MATERIAŁÓW DO ŚRÓDOPERACYJNEJ HEMOSTAZY

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

ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ I CHIRURGII RĘKI AKADEMII
MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU
OKRĘGOWY SZPITAL KOLEJOWY WE WROCŁAWIU

Streszczenie

Pomimo znacznego postępu w technikach chirurgicznych, śródoperacyjne krwawienie z narządów mięszowych nadal stanowi poważny problem. W ciągu ostatnich lat wprowadzono do praktyki chirurgicznej szereg wchłaniających, hemostatycznych materiałów.

Celem pracy była ocena przydatności wybranych materiałów hemostatycznych w praktyce chirurgicznej w zaopatrywaniu uszkodzonych i krwawiących narządów mięszowych, ocena aktywności hemostatycznej w układzie krzepnięcia oraz określenie odczynowości biologicznej badanych materiałów i czasu ich resorpcji.

Materiał i metoda badań

Do zaopatrywania krwawiących ran narządów mięszowych zastosowano 3 syntetyczne opatrunki: celulozowy o nazwie handlowej Surgicel, kolagenowo-fibrynowy o nazwie handlowej TachoComb oraz żelatynowy o nazwie Spongostan Special. Zabiegi przeprowadzono na 42 królikach i 42 szczurach. W trakcie zabiegu wyłaniano pośrodkowy płąt wątroby, śledzionę i nerkę. W płacie wątroby wykonywano 2 rany: kłutą i styczną. Krwawienie z rany kłutej tamowano przez wprowadzenie odpowiednio przyciętego materiału hemostatycznego. Na krwawiącą ranę styczną nakładano badany materiał o wymiarach 2x2 cm. W śledzionie wykonywano ranę kłutą przechodzącą przez cały narząd. Krwawienie tamowano przez wprowadzenie odpowiednio przyciętego opatrunku hemostatycznego. W nerce odcinano owalny fragment kory o wymiarach 0,5x0,3 cm. Krwawiącą ranę zaopatrywano fragmentem materiału hemostatycznego o wymiarach większych niż rana.

W czasie wykonywania zabiegów operacyjnych badano poręczność chirurgiczną poszczególnych materiałów hemostatycznych, tzn. przyleganie do krwawiącej rany, przyczepność do rękawiczek i narzędzi chirurgicznych, nasiąkliwość, przesiąkliwość oraz plastyczność. Mierzono czas po jakim ustawało krwawienie z ran wątroby, nerki i śledziony w zależności od użytego materiału. Ponadto obserwowano zmiany wyglądu materiałów po kontakcie z krwią.

Ocenę aktywności hemostatycznej badanych preparatów wykonano w oparciu o badania wpływu tych preparatów na układ krzepnięcia. Była to ocena *in vitro* mająca na celu określenie i porównanie stopnia aktywacji

COMPARATIVE STUDY OF TOPICAL HEMOSTATIC AGENTS

17
.....

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

ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ I CHIRURGII RĘKI AKADEMII
MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU
OKRĘGOWY SZPITAL KOLEJOWY WE WROCŁAWIU

Abstract

Despite great advance in surgery the intraoperative bleeding of parenchymal organs is still a vital problem. In recent years there have been many hemostatic agents introduced into the surgical technique.

The goal of this paper was evaluation of usefulness of some hemostatic agents in surgical practice in management of lesions of parenchymal organs, testing of hemostatic activity in hemostasis and their biocompatibility and time of resorption.

Materials and methods

Three of topical hemostats were evaluated: oxidised regenerated cellulose named Surgicel, collagen fleece covered with fibrin glue - Tachocomb and gelatine sponge named Spongostan Special. Animal tests were conducted on 42 rabbits and 42 rats. During the operation medial lobe of liver, kidney and spleen were excavated. In the lobe of liver two wounds were made: one - stab and the other tangential. Haemorrhage from the stab wound was stopped by insertion of the properly cut piece of the hemostatic agent. The tangential wound was covered with a piece of material, dim. 2x2 cm. The spleen was punctured straight through. The haemorrhage was stopped with a plug of hemostatic agent. The pole of the kidney was cut and a oval piece of cortex 0,5x0,3 cm was removed. Laceration of the organ was covered with a piece of hemostatic material larger than the lesion.

During the operation surgical handiness was evaluated. Sticking to the wound, surgical gloves and instrumentation, soaking with blood, transudation with blood and plasticity were tested. The clotting time i.e. time after which the haemorrhage from liver, kidney and spleen was stopped was measured. Moreover change of the appearance after contact with the blood was observed.

Evaluation of the hemostatic activity of the three hemostatic agents made of oxidised cellulose (Surgicel), fibrin glue coated collagen fleece (TachoComb) and gelatine sponge (Spongostan) was made by testing the influence on coagulation system. It was an *in vitro* analysis to estimate and compare activation of the coagulation proteins by the investigated materials. After

białek układu krzepnięcia przez badane preparaty. Osocze cytrynianowe otrzymane z ludzkiej krwi inkubowano z badanymi opatrunkami. Po określonym czasie kontaktu z próbkami materiałów wykonywano badania układu krzepnięcia. Obejmowały one oznaczenia: czasu kefalinowo-koalinowego, protrombinowego, trombinowego, rekalcynacji oraz stężenia fibrynogenu.

Omówienie wyników badań

Przeprowadzone badania biologiczne *in vitro* i *in vivo* materiałów przeznaczonych do hemostazy miejscowej wykazały dużą biogodność gąbki kolagenowo fibrynowej, gąbki żelatynowej i siatki celulozowej.

Wyniki badań śródoperacyjnych oraz badań sekcyjnych potwierdziły wysoką skuteczność zastosowanych preparatów w opanowaniu krwawienia miejscowego, szczególnie krwawienia z narządów mięsnych. Różnice pomiędzy preparatami dotyczyły poręczności chirurgicznej, czasu potrzebnego do całkowitego zahamowania krwawienia oraz czasu wykrzepiania krwi.

Preparat z oxcelulozy Surgicel z łatwością dopasowywał się do kształtu rany i powierzchni uszkodzonego narządu. Nie przylepiał się do rękawiczek i narzędzi chirurgicznych. Opatrunek wykazywał dużą przesiąkliwość krwi w początkowej fazie hemostazy. Dopiero po całkowitym wykrzepieniu, które następowało po ok. 5-6 min., stawał się szczelny. W tym czasie zmieniał swoją postać z białej siatki na brunatną masę.

Opatrunek kolagenowo-fibrynowy TachoComb, należący do materiałów hemostatycznych najnowszej generacji, w czasie zabiegu przylepiał się do rękawiczek i narzędzi chirurgicznych, co w pierwszym momencie utrudniało zdeponowanie go w krwawiącej ranie. Poręczność chirurgiczną opatrunku poprawiono przez wstępne namoczenie go w soli fizjologicznej, co zwiększało jego plastyczność i przyleganie do rany. Opatrunek TachoComb szybko nasiąkał krwią; w okresie ok. 2 min. zatrzymywał krwawienie i uniemożliwiał przesiąkanie krwi na zewnątrz. Po nasączeniu krwią, opatrunek zmieniał swoją postać z białej gąbki na różową, galaretowatą masę dobrze przylegającą do powierzchni rany.

Opatrunek żelatynowy Spongostan wykazywał zwiększoną przyczepność do rękawiczek i narzędzi chirurgicznych, jego sztywność i łamliwość utrudniała zdeponowanie go w ranie, a przyczepność do powierzchni rany w początkowej fazie hemostazy była mała. Bardzo wolno nasiąkał krwią, nie przesiąkał a po ok. 4 min. zatrzymywał krwawienie przybierając postać żółtawej gąbki.

Podsumowując obserwacje śródoperacyjne stwierdzono, że najłatwiejszym w zastosowaniu podczas zabiegu był Surgicel, ale osiągnięcie pełnej hemostazy wymagało najdłuższego czasu. TachoComb wprawdzie wykazywał przyleganie do narzędzi chirurgicznych i rękawiczek jednak w najkrótszym czasie hamował krwawienie i pewnie przylegał do rany. Spongostan ze względu na swoją sztywność i wolne wsiąkanie krwi, okazał się w czasie zabiegu najmniej pewny w zaopatrywaniu ran o dużej powierzchni.

W ocenie poręczności chirurgicznej badane materiały hemostatyczne uszeregowano w następujący sposób. Za najlepszy uznano Surgicel, następnie TachoComb, a najmniej poręczny okazał się Spongostan. W ocenie szybkości i skuteczności hemostatycznej, najbardziej przydatnym okazał się TachoComb następnie Spongostan, a najmniej skuteczny był Surgicel.

Badania sekcyjne pozwoliły określić zachowanie się opatrunków w kontakcie z tkankami i określenie czasu ich resorpcji.

certain time of incubation in human citrated plasma APTT, prothrombin time, thrombin time, recalcination time and fibrinogen concentration was determined.

Results

Biological tests conducted *in vitro* and *in vivo* have shown high biocompatibility of oxycellulose mesh, fibrin-collagen fleece and gelatine sponge.

Results of intraoperative and pathological investigation confirmed high effectiveness of these materials in local hemostasis. Hemostatic agents differ in handiness, time necessary to completely stop the bleeding and the clotting time.

Oxycellulose agent- Surgicel easily adjusted to the shape of the surface of the wound. It did not adhere to the surgical gloves and instruments. The blood easily soaked through the material in the initial phase of coagulation. After the complete coagulation, which took 5 minutes, dressing became entirely tight. At this time it changed from white mesh to dark brown mass.

Fibrin coated collagen fleece - TachoComb which belongs to modern hemostatic agents at the time of operation stuck to the gloves and to the instruments, which initially made deposition of the material in the wound difficult. Surgical handiness could be increased by soaking it in saline which improved its plasticity and adherence to the wound. TachoComb quickly soaked with blood and after 2 minutes was completely tight. After soaking up with blood the material changed into pink, gelatinous mass, well adhering to the surface of the wound.

Gelatine foam - Spongostan was highly adherent to the surgical gloves and instruments. The sponge was stiff and brittle, which made its deposition in the wound difficult and the adherence to the wet surface was low. It soaked with the blood very slowly and after 4 minutes it was completely tight. Spongostan changed into a yellowish sponge.

Resuming the intraoperative observations it can be stated that the most applicable material during the operation was Surgicel but the time of full hemostasis was the longest. Although TachoComb adhered to the gloves and instruments, it stopped bleeding the most quickly and securely stuck to the wound. Spongostan was stiff, its soaking with blood was the slowest and it poorly adhered to the surface of the extensive wound.

The handiness ranking of the hemostatic agents could be as follows: the best was Surgicel, the next TachoComb and the worst - Spongostan. The quickest and the most effective in hemostasis was TachoComb, the following was Spongostan and the least effective was Surgicel.

Pathological examinations allowed to state the behaviour of the hemostats in contact with the tissues and time of resorption.

In group I - Surgicel, 3 days after implantation lesions formed during the operation were filled up with brownish-yellow mass of dressing, sticking well to the wound surface. The rest of the material was seen 7 days after the operation. 14 days after the operation and later the lesion was covered with a thick white tissue.

In group II - TachoComb, 3 days after the operation with the hemostatic agent at the surface of the parenchymal organ had a fibrous structure and adhered strongly to the surface of the wound.

In the following macroscopic observations TachoComb lost its structure and changed into white mass visible after 28 days. After that time lesion was covered with a thick white tissue.

In group III - Spongostan during pathological examination 3,7,14 and 28 days after the operation, well preserved, yellow spongiform protrusions were observed

W grupie I-Surgicel, 3 dni po operacji wykonane ubytki były wypełnione opatrunkiem w postaci brązowo-żółtych splekanych mas, dobrze przylegających do dna rany i widoczny był jeszcze 7 dni po zabiegu. 14 dnia i w kolejnych terminach sekcji ubytki były pokryte białą, grubą tkanką.

W grupie II TachoComb, 3 dni po zabiegu operacyjnym opatrunek na powierzchni narządu miał wyraźną włóknistą strukturę i mocno przylegał do rany. W kolejnych obserwacjach makroskopowych opatrunek zatracił swoją włóknistą strukturę i przybierał wygląd białej masy, widocznej do 28 dnia po zabiegu. Po tym okresie operowane miejsce pokryte było białą, grubą tkanką.

W grupie III-Spongostan w badaniach sekcyjnych od 3 do 28 dnia po operacji, stwierdzono dobrze zachowany opatrunek w postaci żółtej, nasączonej gąbki, wystającej ponad powierzchnię narządów. W obserwacjach po 2 i 3 miesiącach rany wypełniała biała, gruba tkanka.

Na podstawie badań makroskopowych przeprowadzono klasyfikację szybkości resorpcji ocenianych preparatów. Najszybciej wchłaniał się Surgicel, kolejno TachoComb, a najwolniej Spongostan.

Przeprowadzone badania histologiczne pozwoliły określić charakter i wielkość nieswoistego procesu zapalnego, który towarzyszył w gajaniu się preparatów hemostatycznych oraz określić czas ich resorpcji. Oceniane materiały wywoływały mały i krótkotrwały odczyn zapalny. Faza wysiękowa trwała do 3 dnia po zabiegu operacyjnym i charakteryzowała się wysiękiem włóknikowo-komórkowym, w którym przeważały elementy morfotyczne krwi, takie jak: erytrocyty, limfocyty, komórki plazmatyczne oraz fibroblasty. W pojedynczych przypadkach, w ocenianych preparatach histologicznych, obserwowano pojawienie się nielicznych granulocytów wielopłatowych obojętnochłonnych. Krótki okres fazy wysiękowej oraz rodzaj komórek jakie towarzyszyły tej fazie, świadczy o występowaniu minimalnego stopnia nieswoistego procesu zapalnego wokół implantowanych materiałów (Rys. 1,2,3). Faza proliferacyjna rozpoczynała się między 3 a 7 dniem po implantacji. 7 dnia we wszystkich preparatach histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną oraz metodą Van Gieson obserwowano rozplem młodej, bogatokomórkowej, unaczynionej tkanki łącznej z przewagą fibrocytów i włókien klejorodnych. Miejsce po zresorbowanym materiale wypełnione było początkowo bogatokomórkową tkanką łączną. W bezpośrednim sąsiedztwie resztek materiału, dłużej występowały komórki charakterystyczne dla fazy wysiękowej. Proces dojrzewania tkanki łącznej przebiegał od miejsca kontaktu tkanek z opatrunkiem w kierunku jego niezresorbowanych resztek, tworząc tkankę łączną, w której można było wyróżnić strefę zewnętrzną włóknistą i wewnętrzną bogatokomórkową. Oprócz opisanych wyżej cech wspólnych, dotyczących charakteru i nasilenia odczynu tkankowego, stwierdzono różnice ilościowe w szybkości resorpcji między poszczególnymi opatrunkami hemostatycznymi. Najszybciej resorbowany przez komórki był materiał Surgicel, którego fragmenty widoczne były w preparatach histologicznych, wykonanych z operowanych narządów do 14 dnia. W obrazie mikroskopowym w preparatach wykonanych ze wszystkich narządów w grupie II-TachoComb, resztki preparatu widoczne były do 28 dnia, a w grupie III-Spongostan spotykano je jeszcze w preparatach wykonanych do 60 dnia po implantacji. W terminach późniejszych nie stwierdzono obecności opatrunku a w tym miejscu widoczny był rozplem tkanki łącznej. Na podstawie przeprowadzonych badań histologicznych stwierdzono, że odczynowość biologiczna badanych materiałów była proporcjonalna do czasu całkowitej ich resorpcji w tkankach. Najszybciej wchłaniany był Surgicel,

on the surface of the organ. After 2 and 3 months the lesion was covered with a thick white tissue.

On the basis of macroscopic observations hemostatic agents were classified as follows: the quickest resorption was shown by Surgicel, slower by TachoComb and the slowest by Spongostan.

Histologic examinations permitted to establish the type and extent of inflammation as well as time of resorption. Tested materials evoked small and short-term inflammation. Phase of exudation took 3 days and the exudation consisted mainly of: erythrocytes, leukocytes, plasmatic cells and fibroblasts. In separate cases single granulocytes were seen. Short period of exudation phase and type of cells seen at that time showed minimum intensity of inflammation around the implanted materials (Fig.1,2,3).

Proliferation phase began between 3 and 7 days after the implantation. 7 days after the operation in all specimens, H&E stained and Van Gieson stained, development of young, cell-rich connective tissue was noticed with dominating fibrocytes and collagen fibres. The place where the hemostatic agent was resorbed was filled up initially with a cell-rich connective tissue. Maturation of the connective tissue proceeded from the place of contact of the organ with a dressing to the remnants of the dressing. The connective tissue had two layers, external fibrous and internal cellular.

In addition to the above described common features, differences were observed in resorption time. The quickest resorption was by Surgicel, which remnants were seen in specimens up to 14 days. Fragments of TachoComb were observed up to 28 days and rest of Spongostan could be noticed up to 60 days. After that time only connective tissue could be seen at the place of intervention.

On the basis of histologic examinations it could be stated that biological reactivity of the tested materials was proportional to the time of complete resorption. The material with quickest resorption - Surgicel - left the thinnest scar tissue, TachoComb was resorbed longer and Spongostan had the longest resorption time.

On the basis of the in vitro tests it could be stated that Surgicel activated proteins of the human coagulation system and decreased their activity in plasma. It is a coagulation activator. After insertion in human plasma the fibres of Surgicel became loose and were incorporated in clot. TachoComb and Spongostan inserted in human serum did not form the clot. Spongostan swelled more than TachoComb but did not lose its structure. TachoComb and Spongostan did not change the activity of proteins of the coagulation system. TachoComb activated the coagulation system but did not increase their activity. Spongostan observed for 30 minutes did not change the activity of coagulation proteins. The clotting system parameters were comparable with those of the control plasma.

Conclusions

1. Experiments conducted on hemostatic agents revealed that they differ in time of resorption and intensity of tissue response. The quickest resorption was shown by Surgicel, the slowest - 60 days by - Spongostan.
2. Biological reactivity of hemostatic agents is proportional to their time of resorption.
3. TachoComb stopped bleeding from parenchymal organs in approximately 2 minutes, Spongostan in 4 minutes, and Surgicel in 6 minutes.
4. On the basis of intraoperative examination it was stated that the best dressing for extensive wounds in parenchymal organs was fibrin coated collagen fleece TachoComb.

a powstała w tym miejscu blizna łącznotkankowa była najcięższa. Nieco dłużej wchłaniany był opatrunek TachoComb, a następnie Spongostan, wokół którego najdłużej występowały komórki odpowiedzialne za nieswoisty proces zapalny. Na podstawie uzyskanych wyników badań in vitro stwierdzono, że preparat celulozowy Surgicel w znacznym stopniu aktywuje białka układu krzepnięcia krwi ludzkiej, zmniejszając ich aktywność w osoczu. Surgicel wykazuje właściwości aktywatora krzepnięcia. Po zetknięciu z osoczem jego włókna ulegają rozluźnieniu i jednocześnie wchodzi w skład utworzonego skrzepu. Po umieszczeniu próbek preparatu TachoComb i Spongostan w osoczu nie obserwowano tworzenia się skrzepu. Spongostan ulegał w większym stopniu spęcznieniu niż TachoComb, nie zmieniając swej struktury. TachoComb po napęcznieniu tracił swój pierwotny kształt.

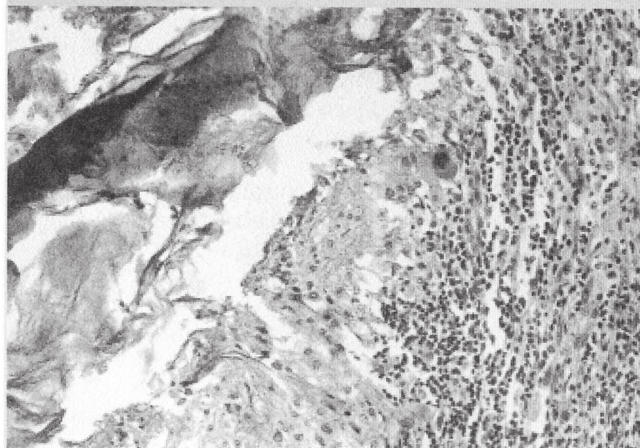
Preparaty TachoComb oraz Spongostan nie zmieniały w sposób znaczący aktywności białek układu krzepnięcia. TachoComb aktywował białka układu krzepnięcia, ale bez obniżenia ich aktywności. Spongostan w obserwacji do 30 min. kontaktu z osoczem, nie zmienia aktywności białek układu krzepnięcia. Wartości pomiarowe czasów krzepnięcia są porównywalne z osoczem kontrolnym.

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań doświadczalnych materiałów przeznaczonych do hemostazy miejscowej wykazano że różnią się one czasem resorpcji i są resorbowane z minimalnym nasileniem odczynu tkanek. Najszybciej ulega resorpcji Surgicel - 14 dni, Tachocomb - 28 dni a najpóźniej Spongostan - 60 dni.
2. Odczynowość biologiczna badanych materiałów doświadczalnych przeznaczonych do hemostazy miejscowej jest proporcjonalna do czasu ich resorpcji w tkankach.
3. Najszybciej uzyskano zatrzymanie krwawienia z narządów mięsnych stosując TachoComb - około 2 minut. Spongostan zatrzymywał krwawienie po około 4 minutach a Surgicel po 6 minutach.
4. Na podstawie badań śródoperacyjnych stwierdzono, że najlepszym materiałem do hamowania krwawienia z dużych powierzchni narządów mięsnych jest gąbka kolagenowo-fibrynowa.

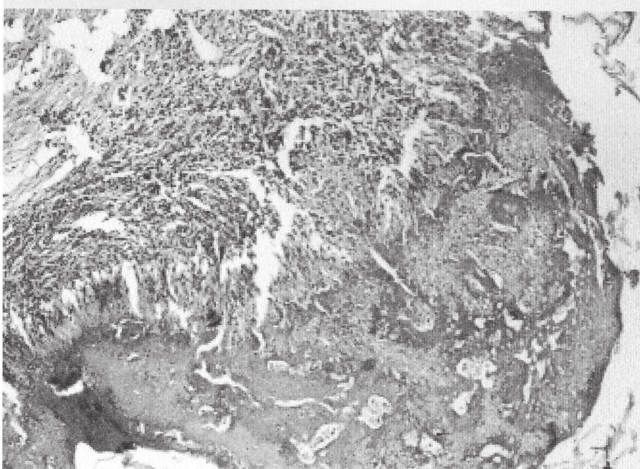
Piśmiennictwo References

- [1] Bomski H.: Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne, WL PZWL 1995, 226-320.
- [2] Głowiński S.: Aktywność hemostatyczna biomateriałów. w Problemy biocybernetyki i inżynierii biomedycznej, T4, Biomateriały, Red. H. Kuś, Wyd. Kom. i Łączn. Warszawa 1990, 133-139.
- [3] Staniszevska-Kuś J.: Badania biologiczne hemostatycznych właściwości różnych preparatów kolagenów, Polimery w medycynie, t. XV, nr 1-2, (1985), 21-33.
- [4] Wagner W.R. i wsp.: Comparative in vitro analysis of topical hemostatic agents, J. of Surg. Res., 66, (1996) 100-108.



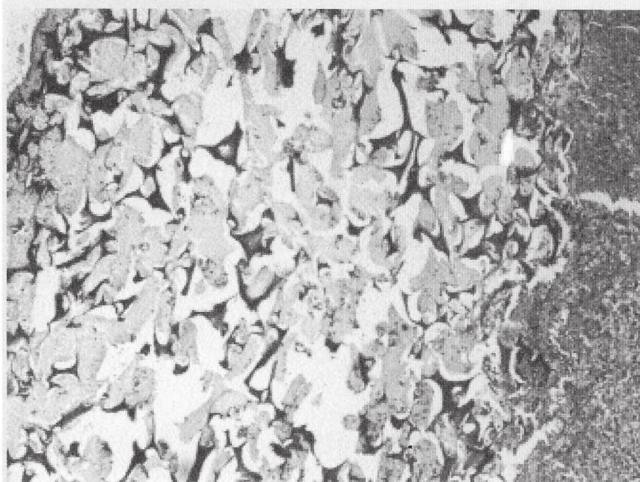
RYS.1. Obraz mikroskopowy preparatu Surgicel w 3 dni po implantacji (H&E, 200x).

FIG.1. Microscopic image of Surgicel 3 days after implantation (H&E, x200).



RYS.2. Obraz mikroskopowy preparatu TachoComb w 3 dni po implantacji (H&E, 200x).

FIG.2. Microscopic image of TachoComb 3 days after implantation (H&E, x200).



RYS.3. Obraz mikroskopowy preparatu Spongostan w 3 dni po implantacji (H&E, 200x).

FIG.3. Microscopic image of Spongostan 3 days after implantation (H&E, x200).