

Морфологические изменения в области ложа желчного пузыря после воздействия препарата «Гемостоп» в эксперименте

Ю.А. Степанов¹, Н.Н. Каркищенко², М.Ф. Черкасов¹, В.Н. Каркищенко², Г.Д.Капанадзе²

¹– Ростовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Ростов-на-Дону

²– Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Гия Джемалиевич Капанадзе

В опыте на 25 животных была изучена эффективность отечественного гемостатического препарата «Гемостоп». В эксперименте была доказана эффективность препарата в достижении окончательного гемостаза при кровотечении из ложа желчного пузыря при холецистэктомии.

Ключевые слова: гемостоп, кровотечение, холецистэктомия.

Введение

В гепатобилиарной хирургии одними из важнейших задач, требующих новых подходов к решению, являются надежный и нетравматичный гемостаз и билистаз, от которых во многом зависит благоприятное течение послеоперационного периода. Описано множество методов остановки кровотечения при операциях на печени, однако проблема остается нерешенной [1].

Материалы и методы

В эксперименте на 25 мини-свиньях светлогорской породы в возрасте 6 месяцев с массой 20-22 кг проведены исследования по изучению морфофункциональных изменений в области ложа желчного пузыря при применении препарата «Гемостоп» после выполнения холецистэктомии.

Эксперимент предусматривал моделирование условий операции холецистэктомии. Всем животным выполнялась холецистэктомия с использованием для обработки ложа желчного пузыря препарата «Гемостоп».

Мини-свиньи для исследования процессов, происходящих в ложе желчного пузыря после применения препарата «Гемостоп» выбраны как достаточно хорошо изученный объект, имеющий много общих черт с человеком в анатомии и физиологии. Длина желчного пузыря у мини-свиней светлогорской породы составляет в среднем 6,0 — 10,0 см, своим дном прилежит к вентральному краю печени, что удовлетворяет условиям эксперимента.

Экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Министер-

ства Здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года.

Эксперимент проводился в специально оборудованных операционных в асептических условиях на V-образном столе желобе, изготовленного из металла-дюрала, отличающийся легкостью (5 кг), прочностью и устойчивостью к агрессивным средам и дезинфицирующим растворам в положении лежа на спине с фиксацией всех четырех конечностей [2].

Под 5% раствором тиопентала-натрия в физиологическом растворе внутривенно, после обработки операционного поля, всем мини-свиньям выполнялась лапаротомия, выделялся желчный пузырь и производилась типичная холецистэктомия от шейки с раздельной перевязкой пузырной артерии и пузырного протока. При выделении желчного пузыря из ложа не производилась его коагуляция а с целью гемостаза использовался новый отечественный препарат «Гемостоп».

«Гемостоп» является производным цеолита NaCaAX, обладающего высокой абсорбирующей способностью. Гемостатический эффект основан на быстром влагопоглощении. При контакте с кровью поглощается большой объем воды относительно массы и объема препарата, что приводит к локальной концентрации клеточных и крупных белковых компонентов крови (в т.ч. факторов свертывания), это в свою очередь индуцирует формирование кровяного сгустка. Кроме того, поверхностный потенциал цеолита способствует активации XII фактора свертываемости крови и тромбоцитов. «Гемостоп» также содержит кальций, который является ко-фактором во многих звеньях коагуляционного каскада. При использо-

вании изделие легко заполняет полость раны, не фиксируется к тканям, не всасывается, после применения легко удаляется механическим путем.

Порошок в количестве 20-25 грамм засыпали в ложе желчного пузыря, тампонировали марлевой салфеткой и через 5 минут удаляли тампон и вымывали остатки порошка для контроля гемостаза. Гемостаз считался достигнутым когда после удаления остатков порошка не наблюдалось видимого паренхиматозного кровотечения. Отметим, что во всех случаях после применения препарата, дополнительного гемостаза не понадобилось. По завершении операции брюшная полость ушивалась послойно наглухо. Кровопотеря во время операции составляла 100-150 мл.

Все животные хорошо перенесли операцию. Через 2–3 дня их было трудно отличить от неоперированных. Данные операции и послеоперационного наблюдения заносили в протокол. Срок наблюдения после операции от 1 до 14 суток. Общее состояние животных оценивали по их поведению, отношению к пище. В первый день послеоперационного периода животные получали только воду и находились на голодной диете, со второго дня их переводили на свободное кормление.

Животные выводились из эксперимента на 1 (5 свиньи), 3 (5 свиней), 5 (5 свиньи), 7 (5 свиньи) и 14 (5 свиней) сутки после оперативного вмешательства путем передозировки 5% раствора тиопентала-натрия введенного внутривенно.

Морфологическое исследование осуществлялось сразу после выведения животных из эксперимента. Проводилось макроскопическое описание ложа желчного пузыря и окружающих тканей и ор-

ганов. Для микроскопического исследования забирались фрагменты ложа желчного пузыря, обработанные препаратом «Гемостоп». Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, который после стандартной парафиновой проводки и изготовления парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и оригинальным методом по Маллори (специализированные окраски соединительной ткани). Аргирофильные волокна выявлялись методом серебрения по Футу, эластические — окраской по Вейгерту, для определения углеводных соединений использовалась ШИК-реакция. Микроскопическое исследование проводилось на микроскопе «DME» фирмы «LEICA» (Германия). Документирование результатов исследования выполнялось с помощью компьютерной программы анализа изображения «ДиаМорф Cito-W» (Россия), совмещенной с микроскопом.

Результаты и их обсуждение

Обзорная световая микроскопия гистологических препаратов печени экспериментальных мини-свиней спустя сутки после хирургического удаления желчного пузыря и обработки его ложа препаратом «Гемостоп» убеждает, прежде всего, в наличии в структурной организации органа классических пяти-шестигранных печеночных долек, разделенных тонкими прослойками рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью. В принципе сохранено и балочное строение печеночных долек. В стенках обнаруживаемых в междольковой соединительной ткани кровеносных сосудов очевидны некоторые проявления деструктивных изменений — гомогенизация цитоплазмы

эндотелиоцитов и гладких миоцитов, гиперхроматоз их ядер. Утрата контуров клетками соединительной ткани сопряжена с незначительным отеком стромы печени. В просвете междольковых сосудов обычно обнаруживаются конгломераты из утративших форму и сконцентрировавшихся в сплошную массу эритроцитов. Характерные для междольковых кровеносных сосудов проявления подобного «застоя» эритроцитов также распространяются и во внутريدольковые кровеносные капилляры (обычно расширены, особенно в центре дольки), центральные вены и поддольковые вены оттока крови их печеночной паренхимы. В их просветах весьма типично присутствие сгустков склеившихся и измененных по форме эритроцитов (рис. 1). В междольковых желчных выводных протоках весьма четко контурирован однослойный однорядный призматический каемчатый эпителий с малым объемом цитоплазмы эпителиоцитов и близ расположенными ядрами. Кариоплазма некоторых ядер гомогенизирована. В большинстве их видны глыбки хроматина и мелкие ядрышки.

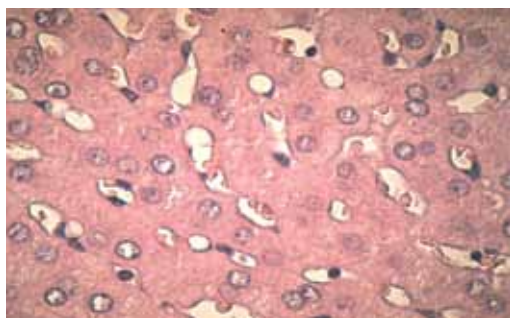


Рис. 1. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Свободнолежащие, агрегированные и агглютинированные эритроциты в расширенных синусоидах печени. Некроз и двухядерные гепатоциты. Окраска: гематоксидин — эозин. Ув.х400

Морфологические изменения (локальные) очевидны и в более крупных артериальных (субсегментарных) и венозных синусах печени. По отношению к центрально проходящим в печеночных дольках венам (центральный) демонстративно радиальное расположение печеночных балок и внутريدольковых синусоидальных кровеносных капилляров. Гепатоциты периферических отделов долек в основном лежат сплошной массой «тесно прижавшись» друг к другу и кровеносные капилляры между печеночными балками (пластинками) выглядят в виде небольших дилатированных овальных пространств. Печеночные клетки, располагающиеся ближе к центру дольки, имеют крупные светлые ядра с узким ободком гетерохроматина под кариолеммой и типичными ядрышками. Встречаются гепатоциты с двумя ядрами или же с крупными ядрами и ядрышками. Последние обычно увеличены в размере, базофильны и нередко располагаются под кареолеммой. Очагово отмечается мутное набухание или зернистая дистрофия гепатоцитов, не являющаяся тяжелым повреждением клеток. Изредка обнаруживаются одиночные или небольшие группы из 1–3-х печеночных клеток с признаками цитолиза. Цитоплазма гепатоцитов также нередко вакуолизирована. Содержание гликогена весьма вариабельно (вплоть до отсутствия) в разных клетках и в разных дольках, но всегда его снижение более выражено по периферии печеночных долек. В печеночной паренхиме, расположенной под капсулой, гепатоциты также отличаются базофилией ядер и небольшим количеством глыбок хроматина (явно очевидна тенденция его к маргинации) в их кариоплазме, малыми размерами ядрышек, слабой базофилией, вакуолизацией и го-

могенизацией цитоплазмы. Достаточно много двухъядерных клеток.

На поверхности и вне среза ткани печени, а также в просвете сосудов определяются одиночные, разной величины (размером от гепатоцита до лимфоцита), чаще круглые, малопрозрачные, опалесцирующие, ШИК-положительные чужеродные структурные элементы «Гемостопа» с центральным Х-образным или звездообразным дефектом в центре, которые могут фрагментироваться по протяжении этих дефектов и давать клиновидные, округлые или другой формы, но чаще овальные малкие осколки. В просвете сосудов, точнее — синусоидов этих структур могут лежать внахлест, но чаще становятся гомогенными, слабобазофильными. Эти массы эмболизируют просвет синусоидов на большем или меньшем протяжении, прижимают к стенке имеющиеся в просвете синусоидов эритроциты провоцируя их агрегацию или агглютинацию, нарушая или прерывая микроциркуляцию. По мере утилизации эти массы в просвете синусоидов становятся мелкозернистоволоконистыми. Это вещество активно фагоцитируется клетками Купфера, которые раздуваясь при этом фагоцитозе, блокируют просвет синусоида.

На уровне ткани печени и отдельных долек синусоиды очагово расширены. Эндотелиоциты не определяются на значительном протяжении. Количество клеток Купфера увеличено, ядра некоторых из них — резко гипертрофированы. Однако большинство клеток Купфера пребывают в состоянии фагоцитоза, увеличены в размере, имеют овальную или шаровидную форму с отжатым к цитолемме ядром (рис. 2, 3).

В цитоплазме их определяется слабо базофильная, почти бесцветная го-

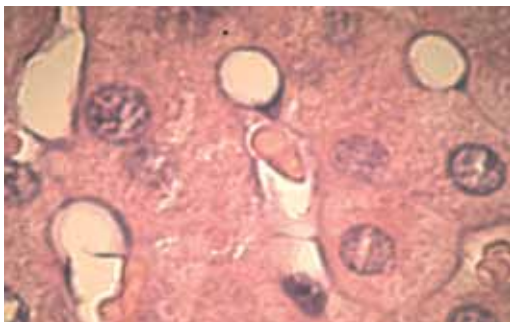


Рис. 2. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Эмболия синусоидов печени «Гемостопом». Фагоцитоз «Гемостопа» клетками Купфера. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х1000

могенная масса, иногда чуть отстоящая от плазмолеммы раздутой клетки Купфера через посредство мелких резорбционных вакуолей. Такие клетки ШИК-отрицательны и часто блокируют просвет синусов. В просвете последних редко встречаются единичные неизмененные эритроциты, или скопления их в виде «монетных столбиков», или остатки разрушенных эритроцитов. Однако на незначительном протяжении отмечается сладжирование крови с формированием очагово перекрывающих просвет синусои-

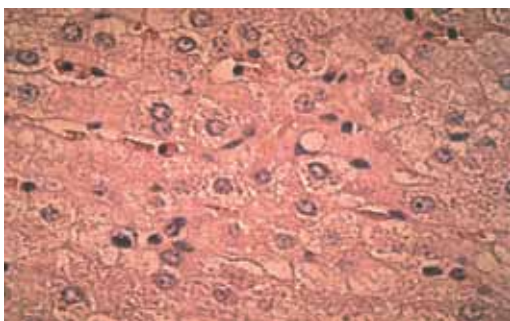


Рис. 4. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Сладжирование крови. Дистрофия гепатоцитов. «Гемостоп», эозинофил в просвете синусоидов. Клетка Купфера (в центре) с фагоцитированным «Гемостопом». Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

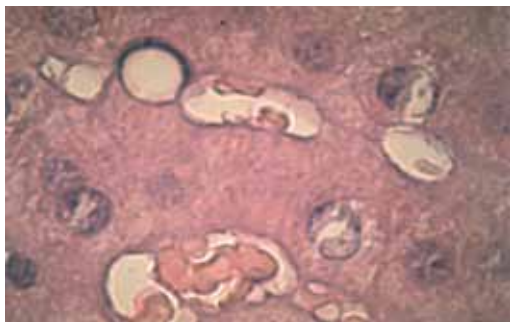


Рис. 3. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). «Гемостоп» и агглютинированные эритроциты в синусоидах печени. Клетки Купфера с фагоцитированным «Гемостопом». Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х1000

дов мелких округлых или удлинённых, прижатых к стенке синусоида структур из агрегированных (чаще) или агглютинированных эритроцитов (рис. 4).

Примечательно, что скопления агглютинированных эритроцитов обычно прижаты к стенке синусоида гомогенными почти бесцветными массами «Гемостопа». Пространства Диссе не определяются. Вены триад содержат эритроциты с выраженным отмежеванием плазмы. Центральные вены чаще пусты, или содержат плазму, или небольшое количество эритроцитов, редко — полнокров-

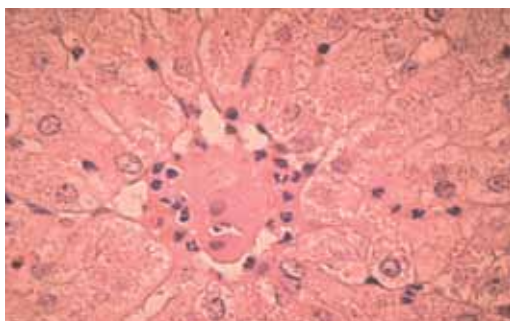


Рис. 5. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Сладжирование крови. Дистрофия гепатоцитов. «Гемостоп», эозинофил в просвете синусоидов. Клетка Купфера (в центре) с фагоцитированным «Гемостопом». Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

ны. Иногда в их просвете определяются полиморфноядерные лейкоциты (рис. 5), колонии микроорганизмов (рис. 6).

Поддольковые вены пусты и содер-

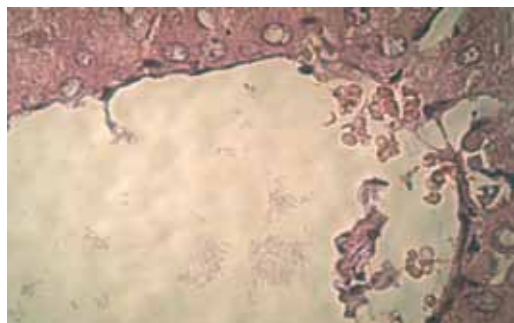


Рис. 6. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Колонии микроорганизмов в просвете центральной вены. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

жат эритроциты или плазму со следами «Гемостопа». В них также встречаются колонии микроорганизмов — вероятный результат блокады клеток Купфера.

При гистологическом исследовании ткани печени экспериментальных животных на 3-и сутки, в отличие от 1-х, наблюдались следующие изменения:

1. Синусоиды чаще были расширены, что является компенсаторно — адаптивной реакцией на гипоксию.

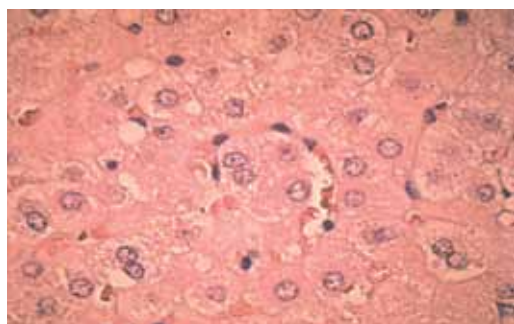


Рис. 7. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (3 сутки). Лизис агглютинированных эритроцитов в синусоидах печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

2. Очагово выражен лизис агглютинированных эритроцитов (рис. 7) и деструкция «Гемостопа», что улучшает реологические показатели крови.

3. В синусоидах (рис. 8) очагово определяются единичные не измененные эритроциты, ПЯЛ и лизирующиеся агглютинаты эритроцитов, а также фрагменты этих клеток, что отражает положительную динамику реологических показателей крови, несмотря на еще часто определяемые очаги агрегации и агглютинации эритроцитов.

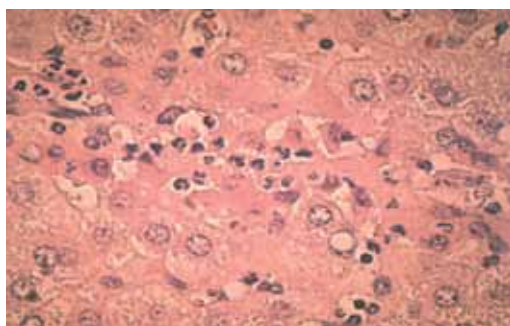


Рис. 8. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (3 сутки). Полиморфноядерные лейкоциты в просвете синусоидов (вверху справа эозинофилы). Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

4. В просвете не только некоторых синусоидов, но и других сосудов (особенно в зоне триад), а также в окружающей соединительной ткани появляются единичные группы полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 9), что свидетельствует об активации микроциркуляции. Отмечаемые явления ПЯЛ — инфильтрации перипортальной соединительной ткани преимущественно в зоне триад. Эти изменения идут на фоне очагового лизиса эритроцитов и деструкции «Гемостопа».

5. Примечательно увеличение количества и дегрануляции эозинофилов

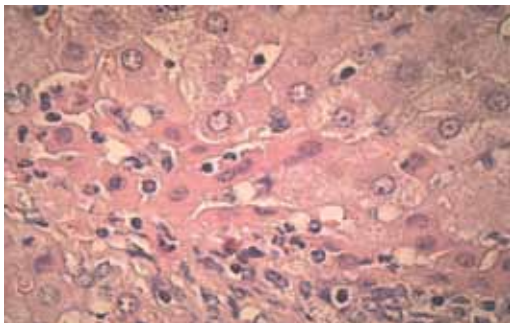


Рис. 9. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (3 сутки). Полиморфноядерная инфильтрация междольковой соединительной ткани печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

(редко до 2-3-х в поле зрения микроскопа при х400).

6. На этом фоне уменьшается выраженность зернистой дистрофии гепатоцитов. Имеющиеся одиночные или небольшие группы гепатоцитов в состоянии колликативного некроза окружаются небольшими (до 10-15 клеток) скоплениями ПЯЛ.

Таким образом, проведенное гистологическое исследование печени экспериментальных животных на 1-е сутки свидетельствует об обнаружении проявлений нарушения микроциркуляции в приречных (поврежденных) участках органа в связи с блокированием прохождения крови по синусоидам. Последние (на этот срок исследования) заполнены «Гемостопом», который очагово не только заполняет просвет синусоидов, но и прессирует имеющиеся в нем эритроциты. Эти изменения очагово нарушают микроциркуляцию и в некоторых других сосудах (полнокровие вен триад или наличие только плазмы в некоторых поддольковых венах).

Поскольку нарушение микроциркуляции в печени не является тотальным, поэтому дистрофические изменения гепатоцитов носят очаговый и нерезко выра-

женный характер и относятся, вероятно, к гипоксическим.

«Гемостоп» активно фагоцитируется клетками Купфера, блокада которых ослабляет иммунитет, что подтверждается наличием колоний микроорганизмов в просвете вен, отводящих кровь из печени.

Как показали гистологические исследования печени экспериментальных животных на 3-и сутки выраженность патологических изменений ее гепатоцитов типа зернистой дистрофии и мелкоочагового некроза с ПЯЛ-инфильтрацией существенно не нарастает и обусловлена, как и на 1-е сутки, состоянием микроциркуляции в органе. Наблюдавшееся ее улучшение, вероятнее всего связано с лизисом агглютинированных эритроцитов и деструкцией «Гемостоп-эмболов». Объективным показателем этого (в том числе и реологии крови) в этот срок является появление полиморфноядерных лейкоцитов в просвете венозных сосудов и синусов.

Фрагменты печени экспериментальных животных, взятые на 5-е сутки после холецистэктомии, в принципе имеют близкое к нормальному строению ее стромы и паренхимы. Прежде всего это относится к кровеносным сосудам и желчным протокам междольковой соединительной ткани. Некоторое исключение составляют проявления реактивности эндотелиальных клеток артерии, приобретающих шарообразную форму, гиперхромия ядер, более выраженную плотность цитоплазмы и направляющих свои (1-3) шипообразные отростки к внутренней эластической мембране интимы. Ядросодержащие участки эндотелия выступают в просвет артерии, обуславливая выраженный бугристый вид ее внутренней поверхности. Эритроциты в просвете сосудов практически все име-

ют форму дисков и лишь в венах изредка обнаруживаются их мелкие конгломераты. Внутريدольковые капилляры имеют просвет в виде щели в участках, прилежащих к центральной вене, а на периферии печеночных долек — ближе к овалу. Междольковая соединительная ткань в виде тонких ее прослоек обуславливает четкое контурирование границ между смежными печеночными дольками. В природной конструкции последних сохранено наличие радиально расположенных между капиллярами печеночных балок, образованных гепатоцитами. Последние несколько увеличены в размерах и характеризуются присутствием зернистого содержимого в цитоплазме. В крупных светлых округлой формы ядрах видны мелкие ядрышки и глыбки хроматина под кариотеккой. Встречаются двухъядерные клетки.

При гистологическом исследовании печени на 7-е сутки у экспериментальных животных нами отмечены следующие существенные изменения в морфологии органа:

1. Продолжается лизис агглютированных эритроцитов и «Гемостоп-эмболов» в синусоидах печени (рис. 10).

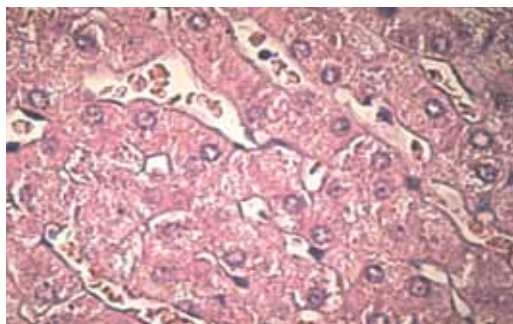


Рис. 10. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (7 сутки). Восстановление реологических свойств крови при лизисе агглютированных эритроцитов и «Гемостопа» в синусоидах печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

2. Нарастает ПЯЛ — инфильтрация некротизированных гепатоцитов; увеличивается количество нейтрофилов и в просвете венозных синусов и синусоидов (рис. 11).

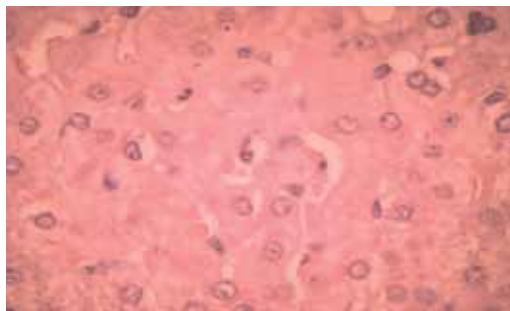


Рис. 11. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (7 сутки). Полиморфноядерные лейкоциты в просвете синусоидов печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

3. Появляются мелкие лимфоклеточные инфильтраты вокруг отдельных атрофированных или единичных некротизированных гепатоцитов.

На 14-е сутки эксперимента в печени подопытных животных также отмечены:

1. Более тщательная ликвидация расстройств реологических свойств крови (рис. 12) на фоне восстановленной ми-

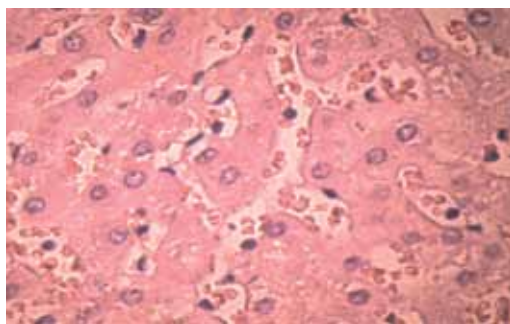


Рис. 12. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (14 сутки). Различная выраженность расстройств реологических свойств крови. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

кроциркуляции в синусоидах печени, поскольку мелкие агрегаты эритроцитов и остатки «Гемостоп-эмболов» еще сохранены в просвете синусоидов (рис. 13).

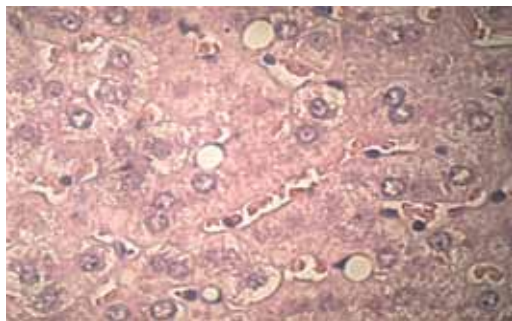


Рис. 13. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (14 сутки). «Гемостоп» в просвете синусоидов и в клетках Купфера (4 клетки). Агглютинация эритроцитов. Гидропическая дистрофия гепатоцитов. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

2. Обнаружение участков с более плотным расположением двуядерных и полиплоидных гепатоцитов.

3. Готовность к полноценному участию в кровоснабжении печени, кроме синусоидов, гораздо большего количества прочих венозных сосудов.

Таким образом, сохранность гепатоцитов и восстановление микроциркуляции в этом сроке наиболее выражена.

Выводы

Проведенные гистологические исследования показали, что «Гемостоп» вызывает мозаичную эмболию синусоидов и сладжирование крови вплоть до агглютинации эритроцитов. Мозаичная блокада синусоидов (очаговый тромбоз при сладжировании крови и «Гемостоп-эмболия») обеспечивают не только гемостатический эффект, но и удовлетворительную сохранность гепатоцитов.

Список литературы

1. *Борисов А.Е., Левин В.А., Земляной В.П. и др.* Технические особенности лапароскопической холецистэктомии и ее осложнения. СПб.: ООП НИИХ СПб ГУ. — 2001. — с. 188.
2. *Каркищенко Н.Н., Грачева С.В.* Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С. — 2010. — с. 358.

Morphological changes in the gallbladder bed after exposure to the drug «Gemostop» in experiment

Y.A. Stepanov, N.N. Karkischenko, M.F. Cherkasov, V.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze

In the experiment on 25 animals were studied the effectiveness of domestic haemostatic drug «Gemostop». In the experiment proved the effectiveness of the drug to achieve final hemostasis in bleeding sludge gallbladder at cholecystectomy.

Key words: gemostop, bleeding, cholecystectomy.