

МЕТОД ПРОФИЛАКТИКИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ЛИМФОРЕИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРЕПАРАТОМ «ТАХОКОМБ» (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Митин С.С., Ануфриева С.С., Куренков Е.Л.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: mitin_sergey@list.ru

Целью исследования явилось изучение клеточной и тканевой реакции на имплантацию препарата «Тахокомб» производства фирмы «Такеда» (Япония) и коллагеновой гемостатической губки производства Лужского завода «Белкозин» в тканях подопытных животных, проведение сравнительного анализа особенностей воспалительного процесса в тканях, сроки элиминации и возможности использования данных препаратов для профилактики послеоперационной лимфорей. Исследование выполнялось в два этапа. Экспериментальная часть исследования проведена на 96 половозрелых крысах женского пола массой тела 200–250 г, выполнялась в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.09.1977 г.), и принципами, изложенными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, Франция, 1986 г.). Клиническое исследование включало 20 пациенток, оперированных по поводу рака молочной железы, перенесших мастэктомию с подключично-подмышечно-подлопаточной лимфаденэктомией. В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что использование Тахокомба не вызывает гранулематозного воспаления в тканях подопытных крыс. Полная элиминация препарата происходит в короткие сроки - до одного месяца. Клинический этап исследования показал значительную эффективность Тахокомба для профилактики послеоперационной лимфорей.

Ключевые слова: Тахокомб, гемостатическая губка, реакция тканей на имплантацию, послеоперационная лимфорей, профилактика.

PREVENTION METHOD FOR POSTOPERATIVE LYMPHORRHEA FOR BREAST CANCER WITH TAKHOKOMB (EXPERIMENTAL-CLINICAL STUDIES)

Mitin S.S., Anufrieva S.S., Kurenkov E.L.

South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, e-mail: mitin_sergey@list.ru

The purpose of the study was to study the cellular and tissue response to the implantation of the drug Tachocomb manufactured by Takeda (Japan) and the collagen hemostatic sponge produced by the Luga Belkozin plant in the tissues of experimental animals. Also, a comparative analysis of the features of the inflammatory process in tissues, the timing of elimination and the possibility of using these drugs for the prevention of postoperative lymphorrhea was carried out. The study was carried out in two stages. The experimental part of the study was conducted on 96 adult female rats weighing 200–250 g. The entire stage of the experimental study was carried out according to the Rules of work with the use of experimental animals (order of the Ministry of health of the USSR № 755 of 12.09.1977) and the principles set forth in the European Convention for the protection of vertebrates used for experiments or other scientific purposes (Strasbourg, France, 1986). The clinical study included 20 patients operated on for breast cancer undergoing mastectomy with subclavian-axillary subscapular lymphadenectomy. In the course of the experiment, it was found that the use of Tachocomb does not cause granulomatous inflammation in the tissues of naked animals. Complete elimination of the drug occurs in a short time - up to one month. The clinical stage of the study showed a significant efficacy of Tachocomb in the prevention of postoperative lymphorrhea.

Keywords: TachoComb, hemostatic sponge, tissue reaction to implantation.

Изучение и анализ научных работ, посвященных различным методикам оперативного лечения паренхиматозных органов, показал, что наиболее часто применяют гемостатические губки, осуществляющие гемостаз [1-3]. Чаще используют средства локального местного

применения, к которым относятся гемостатические губки, в основе действия которых лежит принцип улавливания тромбоцитов из плазмы крови коллагеновым матриксом с последующим формированием кровяного сгустка [4-6]. В доступных нам литературных источниках не встретилось упоминания использования Тахокомба в качестве средства профилактики лимфореи, что обусловило актуальность проведения данного исследования [7-9].

Основные направления нашего исследования: сравнительный анализ клеточной реакции тканей, оценка характеристики воспалительно-клеточного процесса, сроки лизиса материала из тканей, образование соединительнотканного рубца на имплантированные различного производства гемостатические губки, а также оценка возможности применения исследуемых материалов с целью профилактики продолжительной лимфореи у больных, оперированных по поводу рака молочной железы.

Материалы и методы исследования. Проведенное исследование является проспективным, рандомизированным, состоящим из двух этапов. В зависимости от этапа исследования было выделено 2 группы: экспериментальная и клиническая. В ходе выполнения экспериментального этапа группы были выделены в зависимости от применяемого материала. В I группе имплантировался «Тахокомб» производства фирмы «Такеда» (Япония), во II группе – губка коллагеновая гемостатическая производства Лужского завода «Белкозин». Каждая группа исследования включала в себя по 96 половозрелых крыс весом 200-250 граммов.

Содержание и проведение эксперимента осуществлялось в соответствии с правилами и требованиями, предъявляемыми к использованию экспериментальных животных [10; 11].

Экспериментальным крысам в рамках проведения оперативного вмешательства выполнялась стандартная предоперационная подготовка и послеоперационное ведение ран. После введения животного в наркоз производился разрез кожи длиной 15 мм. В зависимости от группы исследования в сформированную рану укладывался фрагмент губки стандартными размерами 10 x 10 мм. Экспериментальные животные выводились из эксперимента на 1, 3, 7, 14, 30 и 60-е сутки на каждом сроке исследования равными группами.

Полученный материал фиксировался и обрабатывался по общепринятым методикам, с более подробным изучением плотности зон некроза соединительной ткани.

В процессе экспериментального этапа исследовалась тканевая реакция на имплантированный материал, в рамках которой изучалось: воспалительно-клеточная реакция, протяженность зоны некротических изменений, продолжительность элиминации препарата, характеристика формирующихся волокон коллагена, окружающих препарат, а также оценка сформировавшегося рубца.

На процессе выполнения клинического этапа нами были выполнены мастэктомии 20 пациенткам, прооперированным по поводу рака молочной железы. Критериями эффективности применения Тахокомба, в соответствии с которыми проводилась оценка результатов, явились: продолжительность и объем лимфорей, временные сроки постановки дренажа по Редону, цитологический состав выделяемой лимфы. Полученный в ходе исследования материал подвергался математико-статистической обработке с использованием статистического пакета Statistica 6,0. В рамках математико-статистического анализа проводился расчет средней арифметической величины, стандартной ошибки средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения. Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах проводилась с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение морфологии тканевых срезов экспериментальных животных на 1-е и 3-и сутки показало, что в I группе в зоне операции отмечался умеренный отек тканей и количество некротических элементов, минимальная полиморфно-ядерная инфильтрация клеточными элементами, что подтверждает полученные статистически значимые различия. Во II группе исследования, при изучении клеточного компонента тканей в области используемого препарата, выявлена значительно выраженная полиморфно-ядерная инфильтрация тканей: в 1-е сутки число нейтрофилов составляла $73,4 \pm 3,6\%$, (в I группе - $47,1 \pm 3,8\%$); на 3-и сутки приходился пик увеличения до $91,1 \pm 4,8\%$, (в I группе $66,9 \pm 3,4\%$). На 14-е сутки в изучаемых тканях II группы на общее число нейтрофилов приходилось $39,2 \pm 3,2\%$, (в I группе - $20,6 \pm 2,8\%$), получены статистически значимые различия для перечисленных показателей ($p < 0,05$).

При анализе состава клеточной инфильтрации оценка содержания других клеточных элементов, а именно макрофагов, эозинофилов, лимфоцитов, также выявила статистически значимые различия в обеих группах, наивысшее число которых приходилось на 7-е сутки: в I группе показатели составили $8,8 \pm 0,5\%$, $6,2 \pm 0,8\%$, $15,1 \pm 1,4$; а во II группе - $6,2 \pm 0,9\%$, $4,7 \pm 0,5\%$, $20,6 \pm 1,1\%$ соответственно ($p < 0,05$).

При сравнении с группой II, в которой выявленная более выраженная плотность некротических тканей - $17,9 \pm 1,5\%$ – в 1-е сутки, $24,3 \pm 1,8\%$ – к 3-им суткам, в I группе общая плотность зоны некроза была ниже и составила: $15,8 \pm 1,5\%$ и $19,7 \pm 2,2\%$ в первые сутки и третьи сутки соответственно, с постепенным уменьшением некротической зоны к 7-м суткам до $9,8 \pm 1\%$ (рис. 1, 2).

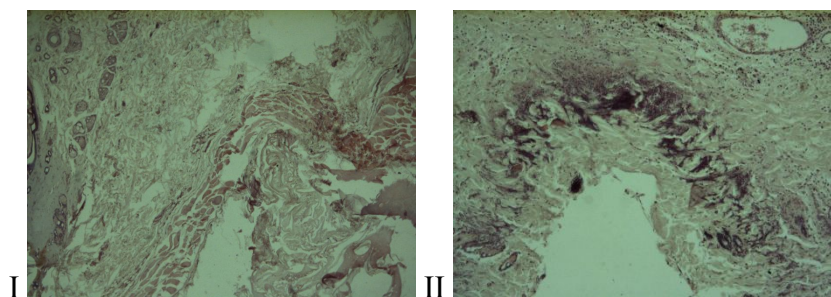


Рис. 1. Микропрепарат тканей крыс в первые сутки эксперимента:

I - вокруг Тахокомба ткани с умеренным отеком; II - вокруг Гемостатической губки: отек, полнокровие сосудов, интенсивная воспалительно-клеточная инфильтрация; окраска гематоксилином и эозином, x100

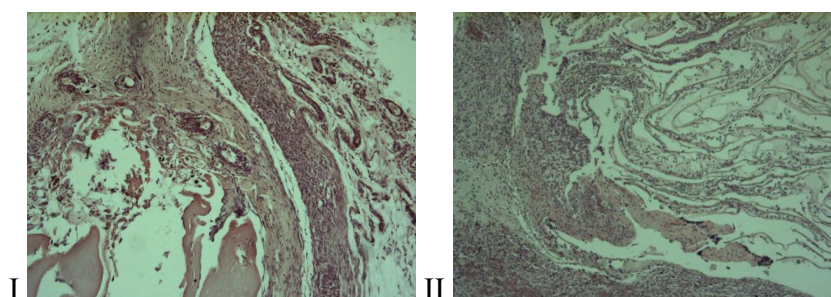


Рис. 2. Микропрепарат тканевых срезов на 3-и сутки эксперимента:

I - скудный демаркационный вал в зоне некроза вокруг Тахокомба; II - элементы Гемостатической губки окружены обширным демаркационным воспалением, отторгшиеся некротические элементы; окраска гематоксилином и эозином, x100

Оценка плотности соединительнотканного компонента в области имплантации материала показала, что у крыс I группы к третьим суткам отмечается появление коллагеновых волокон в объемном отношении $12,1 \pm 1,4\%$, с дальнейшим ростом до $45,2 \pm 2,3\%$ на седьмые сутки, с пиком к 14-м суткам до $47,8 \pm 2,5\%$. К 30-м суткам выявлено снижение плотности коллагеновых волокон до $36,6 \pm 2,1\%$. Также необходимо отметить, что на 7-е сутки в области операции отмечалось активное замещение элементов губки и некротических элементов, некротические изменения тканей отсутствовали, формировалась соединительная ткань. При микроскопическом изучении элементы губки Тахокомба имеют плотную, оформленную, аморфную структуру, без элементов разрушения.

Во II группе так же, как и в I группе, первые сутки характеризуются отсутствием образования соединительной ткани, к третьим суткам плотность соединительнотканного компонента насчитывала $7,1 \pm 1,3\%$, с последующим увеличением до $56,3 \pm 3\%$ на 14-е сутки. При микроскопическом изучении Гемостатическая губка имеет рыхлое, пестрое строение, плохо прокрашиваемое, тогда как Тахокомб обладал гомогенной, плотной структурой, ровно окрашиваемой в ярко-розовый цвет.

В I группе в тканях зоны повреждения начиная с третьих суток отмечалось увеличение числа фибробластов до $28,2 \pm 2,4\%$, с седьмых суток увеличивается плотность соединительной ткани.

Отсутствие воспалительно-клеточной инфильтрации, полная замена структуры Тахокомба, замещение ее фуксинофильными волокнами, формирование зрелой соединительной ткани происходит к 30-м суткам. Также отмечалось снижение числа фибробластов и объемной плотности соединительных волокон в зоне рубца до $68,1 \pm 4,6$ и $36,6 \pm 2,1\%$. Тогда как во II группе количественное содержание фибробластов и плотность соединительной ткани на 30-е сутки составило: $49,3 \pm 3,9\%$ и $51,1 \pm 2,5\%$.

В I группе на 60-е сутки отмечалась полная замена Тахокомба, формировался плотный рубец, состоящий из сформированной соединительной ткани, отсутствовала воспалительная инфильтрация, незначительное содержание фибробластов - $25,6 \pm 2,7\%$ (рис. 3).

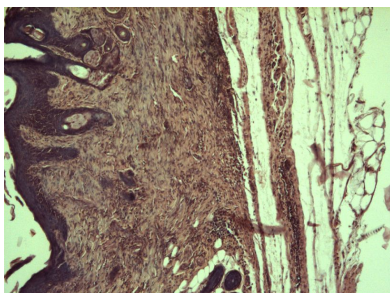


Рис. 3. 60-е сутки – область аппликации Тахокомба: плотный сформированный рубец, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

В отличие от I группы, во II группе выявлена другая динамика процесса. Так, к 14-м суткам в препаратах с имплантированной гемостатической губкой отмечалось сохранение воспалительно-клеточного компонента вокруг препарата, усиление объема соединительнотканного субстрата, при этом элементы губки не элиминировались. Полный лизис гемостатической губки приходится на 30-е сутки, при этом в тканях отмечается формирование гранулематозного воспаления с сохранением нейтрофильной ($1,8 \pm 1\%$), макрофагальной ($2,9 \pm 0,7\%$), эозинофильной ($0,3 \pm 0,1\%$), лимфоцитарной ($2 \pm 0,7\%$), плазмоцитарной ($3,9 \pm 0,7\%$) инфильтрации (различия статистически значимы для перечисленных показателей по сравнению с группой I, $p < 0,05$) (рис. 4).

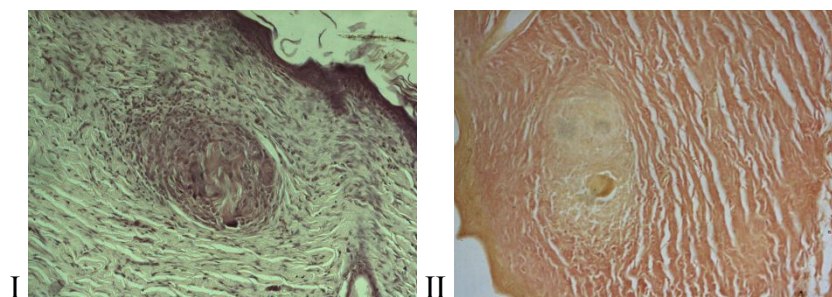


Рис. 4. 30-е сутки – лизис элементов губки, эпителизация кожного покрова, в слоях дермы визуализируется гранулема (гранулематозное воспаление). I - окраска гематоксилином и эозином, x200; II - среди коллагенового каркаса дермы гранулема; окраска пикрофуксином по Ван Гизону, x200

Таким образом, полученные результаты сравнительного анализа морфологического и морфометрического исследования тканей подопытных крыс после аппликации различными материалами показывают, что при использовании Тахокомба лизис исследуемого препарата приходится на 30-е сутки, с формированием зрелого соединительнотканного рубца к 60-м суткам, при этом в тканях отмечается незначительная воспалительно-клеточная реакция. Полученные результаты исследования позволили нам обосновать целесообразность применения Тахокомба в клинической практике при проведении мастэктомии с подмышечной лимфодиссекцией для профилактики продолжительной лимфореи.

После выполненного экспериментального этапа работы проводилась апробация способа на 20 больных раком молочной железы. Основная группа IA (n=10) – пациентки, которым при радикальной мастэктомии в образовавшийся дефект подкрыльцовой ямки, после выполнения лимфаденэктомии в подмышечно-подключичной области, с целью профилактики формирования в послеоперационном периоде лимфореи, на сосудисто-нервный пучок укладывалась коллагеновая пластинка, покрытая фибрином и тромбином «Тахокомб», с постановкой временного дренажа по Редону (ближайшие 5-7 суток). Контрольная группа IIA (n=10) – пациентки с раком молочной железы, которые оперировались по классической методике без применения интраоперационных методик профилактики лимфореи. Оперативное вмешательство у данной группы больных заканчивалась установкой силиконового вакуум-дренажа, выведенного по передней подмышечной линии в проекции нижнего угла раны через контрапертуру.

Перед оперативным лечением диагноз был морфологически подтвержден у 16 больных, что составило 80%, у 4 (20%) – интраоперационно. Морфологическое подтверждение диагноза перед оперативным вмешательством проводилось амбулаторно при помощи пункционной трепанационной биопсии.

В клинической группе IA выявлено значительное сокращение продолжительности

дренирования раны - до $12,3 \pm 1,8$ дня. При этом объем лимфорей в данной группе пациенток составил $289,5 \pm 46,2$ мл.

В клинической группе ПА длительность лимфорей была в 1,9 раза дольше и составила $22,94 \pm 2,7$ дня, при этом общий объем эвакуированной лимфы составил $1005,48 \pm 47,3$ мл. Дренаж в данной группе больных был удален на $19,2 \pm 2,6$ суток (различия в группах IA и ПА статистически значимы для перечисленных показателей, $p < 0,05$).

После сбора эвакуированной по дренажу и пункционных аспираций лимфы пациенток обеих групп её подвергали исследованию и цитологическому изучению.

По данным результатов цитологического исследования выделенной лимфы у пациенток контрольной группы ПА, выявлено, что в первые и четвертые сутки отмечается избыточное количество клеток воспаления до $55 \pm 2,5$, представленных в форме лимфоцитов и гранулоцитов. В последующей динамике имеется тенденция к уменьшению количества лимфоцитов к 14-м суткам стояния дренажа до $22 \pm 3,2$. На 21-е сутки сохраняется наличие клеток воспаления в пределах $15 \pm 1,5$.

По данным цитологического изучения лимфы пациенток основной группы IA, в первые и четвертые сутки количественный состав лимфоцитов составлял $23 \pm 2,1$. В последующей динамике отмечалось снижение лимфоцитарной составляющей лимфы в границах $10 \pm 1,5$ (различия в группах IA и ПА статистически значимы для перечисленных показателей, $p < 0,05$).

Выводы

1. Выполненное нами экспериментально-клиническое исследование выявило высокую эффективность применения коллагеновой пластины Тахокомб с целью предупреждения лимфорей у пациенток, которым выполнена мастэктомия с подмышечной лимфодиссекцией.

2. Введение Тахокомба в ткани характеризуется отсутствием воспалительно-клеточной инфильтрации, в непродолжительный период отмечается полный лизис препарата - до 30 суток.

3. Полученные нами результаты исследования позволяют предположить, что использование губки Тахокомб будет эффективно при применении в различных объемных хирургических операциях, с целью профилактики лимфорей и капиллярного кровотечения.

Список литературы

1. Горский В.А. Технические аспекты аппликации биополимера ТахоКомб при операциях на органах брюшной полости // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. 2001. № 5. С. 43-46.

2. Бунатян А.Г., Завенян З.С., Багмет Н.Н. Проблемы гемостаза и гермитизма при резекциях печени с использованием фибрин- коллагеновой субстанции // Хирургия. 2003. № 9. С. 18-23.
3. Скипенко О.Г., Шатверян Г.А. Применение покрытия «Тахокомб» при хирургических вмешательствах на печени и поджелудочной железе // Хирургия. 1998. № 1. С. 11-14.
4. Santulli P., Marcellin L., Touboul C., Ballester M., Darai E., Rouzier R. Experience with TachoSil in obstetric and gynecologic surgery. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2011. Vol. 113 (2). P. 112-115.
5. Raiffort C., Benabdallah F., Jean-Louis Paillasseur., Gangner Y., Leutenegger E., Sockeel P. Patient eligibility criteria for a surgical treatment that enhances tissue sealing by use of a medicated sponge: observational study ELITE. *Springerplus.* 2013. Vol. 18 (2). P. 613.
6. Maggiore U.L.R., Alessandri F., Ferrero S. Application of Tachosil after laparoscopic myomectomy: a prospective randomized trial. *Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics.* 2011. Vol. 23 (4). P. 15-21.
7. Buda A., Ghelardi A., Fruscio R., Guelfi F., Maria La Manna, Dell'Orto F., Milani R. The contribution of a collagen–fi brin patch (Tachosil) to prevent the postoperative lymphatic complications after groin lymphadenectomy: a double institution observational study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2016. T. 197. P. 156-158.
8. Ospan A. Mynbaev, Tsin D.A., Giorda G., Malvasi A., Guido M., Farr R. Nezhath. Lymphocele prevention after pelvic laparoscopic lymphadenectomy by a collagen patch coated with human coagulation factors: a matched case-control study. *International Journal of Gynecological Cancer.* 2013. T. 23. № 5. P. 956-963.
9. Ghelardi A.C. di Stefano, Galante L., Guelfi F. Inguinofemoral lymphadenectomy in patients undergoing radical vulvectomy for vulvar cancer. A new patch is able to reduce lymphatic complications. *It. J. Gynaecol. Obstet.* 2011. Vol. 23. no. 4. P. 139-146.
10. Navarro-Rodriguez E., Gomez-Luque I., Diaz-Jimenez N., Rioja-Torres P., Bascunana-Estudillo G., Ruiz-Rabelo J.F., Ciria-Bru R., Alvarez-Benito M., Rufi an-Pena S., Briceno-Delgado J. Effectiveness of an absorbable fi brin sealant patch to reduce lymphoceles formation after axillary lymphadenectomy for breast cancer: a matched-pair analysis. *Am. J. Surg.* 2014. Vol. 208 (5). P. 824-830.
11. Gianluca Di Monta, Corrado Caracò, Anna Crispo, Ugo Marone, Nicola Mozzillo. Collagen sealant patch to reduce lymphatic drainage after lymph node dissection. *World Journal of Surgical Oncology. Am. J. Surg.* 2012. no 10. P. 275.