

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛЛАГЕНОВОЙ ГУБКИ ТАХОКОМБ® ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ЛИМФОРЕИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

С.С. Митин, С.С. Ануфриева, Е.Л. Куренков, М.Я. Климович

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Челябинск

Цель исследования. Изучение клеточной реакции тканей на имплантацию препарата Тахокомб® производства фирмы Такеда (Австрия) и коллагеновой гемостатической губки в тканях подопытных животных, а также сравнительный анализ особенностей воспалительного процесса в окружающих тканях, сроки их элиминации и возможности использования данных препаратов для профилактики длительной лимфорей у пациенток, оперированных по поводу рака молочной железы.

Материалы и методы. Экспериментальная часть исследования проведена на 96 половозрелых крысах женского пола, массой тела 200–250 г в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, регламентированных в приказе 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). Клиническое проспективное рандомизированное исследование включало 20 пациенток, перенесших мастэктомию с подключично-подмышечно-подлопаточной лимфаденэктомией.

Результаты. В отличие от стандартной гемостатической коллагеновой губки имплантация Тахокомба в ткани не вызывает гранулематозного воспаления в них. Полная элиминация препарата происходит в короткие сроки — до одного месяца.

Выводы. Клиническая апробация применения Тахокомба во время операции у больных раком молочной железы показала его эффективность для профилактики длительной лимфорей.

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

THE POSSIBILITIES OF THE USE OF COLLAGEN SPONGE TACHOCOMB® FOR THE PREVENTION OF POST-OPERATIVE LYMPHORRHEA IN PATIENTS WITH BREAST CANCER (AN EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDY)

S.S. Mitin, S.S. Anufrieva, E.L. Kurenkov, M.Ya. Klimovich

State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education South Ural State Medical University
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk

Objective of the study — is to research cellular reaction of the tissues to the implantation of TachoComb® preparation produced by «Takeda Austria GmbH» and collagen hemostatic sponge into the tissues of laboratory animals, as well as to conduct a comparative analysis of the features of inflammatory process in the surrounding tissues, terms of their elimination and the possibilities of the use of these preparations for the prevention of prolonged lymphorrhoea in patients who undergo surgery for breast cancer.

Materials and Methods. The experimental part of the study was performed on 96 sexually mature female rats of body mass 200–250 g in compliance with «Guidelines for the care and use of laboratory animals in experimental studies», regulated in the Order № 755 of 12.09.77 of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation and with the principles, outlined in the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, France, 1986). 20 patients who had undergone mastectomy with subclavicular, axillary, subscapular lymph node dissection, were included in the clinical prospective randomized study.

Results. Unlike standard hemostatic collagen sponge, the implantation of TachoComb® into the tissues doesn't induce granulomatous inflammation in them. Complete elimination of the preparation occurs in the short term — up to one month.

Conclusions. Clinical approbation of the use of TachoComb during the surgery in patients with breast cancer showed its effectiveness for the prevention of prolonged lymphorrhea.

Keywords: TachoComb, hemostatic sponge, tissue reaction to implantation, post-operative lymphorrhea, prevention.

В последние годы появилось достаточное количество сообщений о применении различных клеевых субстанций во время проведения хирургических вмешательств. Основное назначение этих субстанций — повышение качества гемостаза в хирургии паренхиматозных органов. Наиболее часто используются гемостатические средства местного применения: коллагеновая гемостатическая губка, содержащая коллаген, который служит матриксом для формирования кровяного сгустка за счет улавливания тромбоцитов, и гемостатическая губка Тахокомб, представляющая собой готовую стерильную коллагеновую губку с нанесенными на одну из ее сторон тромбином и фибриногеном [1–4]. В то же время в доступной нам литературе мы не встретили сравнительных характеристик реакции тканей на данные препараты и сроки их элиминации. Существует ограниченное количество исследований применения гемостатической губки Тахокомб® для профилактики лимфорей [8–10, 13, 14].

Целью нашего исследования явилось изучение клеточной реакции тканей на имплантацию препарата Тахокомб® производства фирмы Такеда (Австрия) и губки коллагеновой гемостатической производства Лужского завода «Белкозин», а также сравнительный анализ особенностей воспалительного процесса в окружающих тканях, сроки их элиминации и возможности использования данных препаратов для профилактики длительной лимфорей у пациенток, оперированных по поводу рака молочной железы.

Материал и методы исследования. Экспериментальная часть исследования проведена на 96 половозрелых крысах женского пола, массой тела 200–250 г. Животные содержались в условиях вивария в клетках по одной особи, находились на стандартном пищевом режиме, при естественном освещении.

Все исследования осуществлялись в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных живот-

ных, регламентированных в приказе 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). Исследование проводилось в соответствии с протоколом на соответствие работы требованиям Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) последнего пересмотра (Эдинбург, 2000) с Ассамблеей ВМА (Вашингтон, 2002).

Для выполнения хирургического вмешательства крыса укладывалась на операционном столе на живот и фиксировалась за четыре конечности. Шерсть тщательно сбривалась в области холки. Операционное поле обрабатывалось трижды раствором антисептика. После внутривенной анестезии в продольном направлении скальпелем производились два параллельных разреза кожи длиной 15 мм на расстоянии 5 см друг от друга. В одну из образовавшихся ран укладывался фрагмент губки Тахокомб® размерами 10×10 мм, в другую — гемостатическая коллагеновая губка тех же размеров. Раны ушивались наглухо однорядными узловыми швами капроном 3/0. Послеоперационные швы обрабатывались раствором антисептика. На кожу накладывалась асептическая повязка. Животные выводились из эксперимента на 1, 3, 7, 14, 30 и 60-е сутки по 16 особей на каждом сроке исследования.

После выведения животного из опыта производилось визуальное исследование состояния тканей в области имплантации материала и их забор для дальнейшего микроскопического исследования.

Полученный материал фиксировали в 10-процентном нейтральном формалине и заливали в парафин. Тканевые срезы толщиной 3–5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии, пикрофуксином по Ван Гизону для выявления фуксинофильных коллагеновых волокон, 0,1-процентным раствором толуидинового синего для определения тучных

клеток по общепринятым методикам (Р. Лилли, 1969).

Объемную плотность зон некроза, соединительной ткани определяли методом точечного счета с использованием окулярной сетки Г.Г. Автандилова на 25 тест-точек при увеличении $\times 400$.

Подсчет абсолютного количества клеток инфильтрата (нейтрофилов, макрофагов, эозинофилов, лимфоцитов, плазмочитов, фибробластов, мастоцитов, эпителиоидных клеток, гигантских клеток инородных тел) производился при увеличении в 400 раз в 3–5 полях зрения каждого микропрепарата (Г.Г. Автандилов, 1990). Подсчитывалось количество клеток на срезе в поле зрения, принятом за условную единицу площади ($S = 0,2 \text{ мм}^2$).

Основная задача экспериментального этапа работы — изучение плотности и протяженности зоны некроза в области операции; выраженность клеточной инфильтрации и состав воспалительного инфильтрата; особенности формирования коллагеновых волокон вокруг изучаемого материала, сроки и полноценность его элиминации; ширина и состав послеоперационного рубца после имплантации Тахокомба (группа I) и гемостатической губки (группа II).

Клиническое проспективное рандомизированное исследование включало 20 пациенток, перенесших мастэктомию с подключично-подмышечно-подлопаточной лимфаденэктомией. У 10 пациенток послеоперационная рана велась стандартно с использованием редон-дренажа (группа I А). Другим 10 пациенткам в подмышечно-подключичную область, закрывая угол, образованный подключичной веной

и оставшимися после лимфаденэктомии тканями грудной клетки, укладывалась губка Тахокомб® размерами 9,5×4,8 см (группа II А). Эффективность применения Тахокомба определяли на основании оценки следующих показателей: длительность и объем лимфорейи, сроки снятия редон-дренажа.

Результаты исследования. Морфологическое исследование тканей животных после выведения из эксперимента на первых и третьих сутках показало, что в I группе животных в зоне интереса отмечался слабый отек тканей, незначительное количество некротических элементов, слабая инфильтрация полиморфноядерными клеточными элементами. Общая плотность зоны некроза составила $15,8 \pm 1,5\%$ и $19,7 \pm 2,2\%$ в первые и на третьи сутки, соответственно, по сравнению с II группой, в которой отмечалась большая плотность некротических тканей: $17,9 \pm 1,5\%$ — в первые сутки, $24,3 \pm 1,8\%$ — на третьи сутки, с последующим уменьшением зоны некроза на 7 сутки до $9,8 \pm 1\%$ (рис. 1, 2).

Оценка плотности соединительнотканного компонента в зоне имплантации исследуемых материалов показала, что уже на третьи сутки у животных I группы отмечается появление коллагеновых волокон в объемном отношении $12,1 \pm 1,4\%$, с последующим ростом до $45,2 \pm 2,3\%$ к седьмым суткам и пиком к 14-м суткам до $47,8 \pm 2,5\%$. Далее происходило уменьшение плотности коллагеновых волокон к 30-м суткам до $36,6 \pm 2,1\%$. При формировании соединительной ткани вокруг зоны имплантации Тахокомба отмечалось отсутствие некротических элементов уже с 7 суток, что свидетельствует об активном замещении элементов

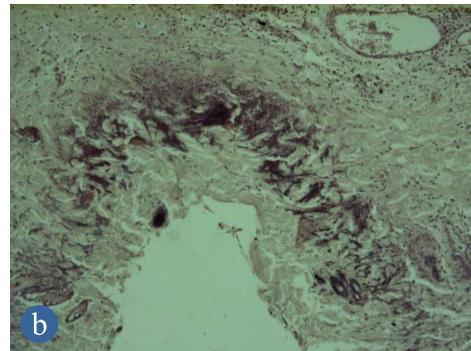
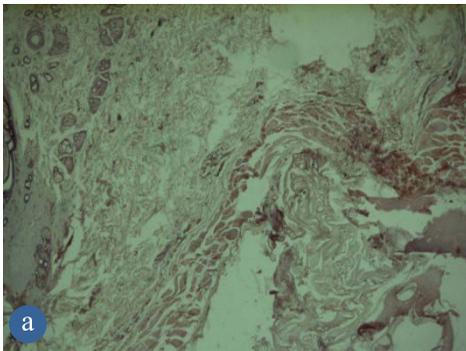


Рис. 1. Микропрепараты тканей крыс в первые сутки эксперимента: **А** — в окружающих Тахокомб тканях умеренный отек; **В** — отек, полнокровие сосудов, интенсивная воспалительно-клеточная инфильтрация в зоне аппликации гемостатической губки; окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

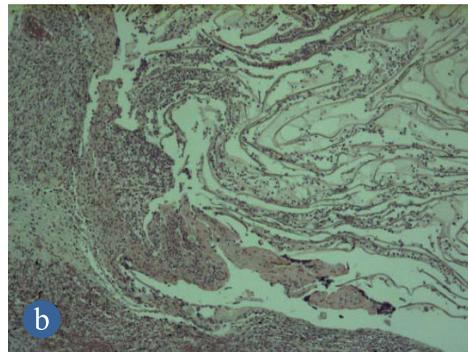
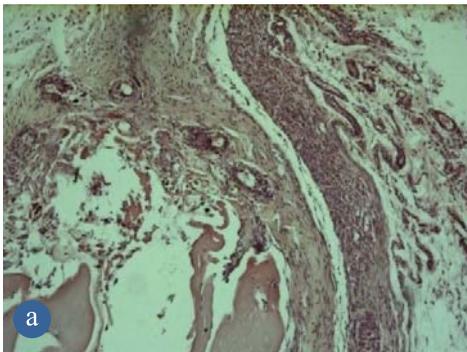


Рис 2. Микропрепараты тканей крыс на третьи сутки эксперимента: **А** — зона некроза вокруг материала Тахокомб имеет скудный демаркационный вал; **В** — вокруг элементов гемостатической губки обширное демаркационное воспаление, отторгающиеся некротические массы, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

пластины и некротических тканей продуцируемым коллагеновым матриксом тканей крыс. Сам фрагмент гемостатической губки Тахокомб® в окружении тканей имеет плотную, оформленную, аморфную структуру, без явлений деструкции.

Во II экспериментальной группе, как и в I группе, в первые сутки формирования соединительной ткани не происходило, к третьим суткам объемная плотность соединительно-тканного компонента составляла $7,1 \pm 1,3\%$, с последующим пиком на 14-е сутки — $56,3 \pm 3\%$. Гемостатическая губка при этом имела пеструю, рыхлую структуру, плохо окрашиваемую гематоксилином и эозином, в то время как коллагеновая пластина в группе I характеризовалась гомогенной, плотной структурой, ровно окрашиваемой в ярко-розовый цвет (рис. 3).

При оценке клеточного состава тканей в зоне операции отмечалась более выраженная полиморфно-ядерная инфильтрация тканей во II группе по сравнению с I группой. Так, на долю нейтрофилов во II группе в первые

сутки приходилось $73,4 \pm 3,6\%$, в I группе — $47,1 \pm 3,8\%$; к третьим суткам отмечался пик подъема до $91,1 \pm 4,8\%$ и $66,9 \pm 3,4\%$ соответственно. К 14-м суткам в тканях крыс с Тахокомбом объемное количество нейтрофилов составляло $20,6 \pm 2,8\%$, в группе с гемостатической губкой — $39,2 \pm 3,2\%$ (различия статистически значимы для перечисленных показателей, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

В составе клеточной инфильтрации также нами оценивалось содержание и других клеточных элементов: макрофагов, эозинофилов, лимфоцитов, наивысшее число которых приходилось на 7 сутки: $8,8 \pm 0,5\%$, $6,2 \pm 0,8\%$, $15,1 \pm 1,4\%$ — в I группе; $6,2 \pm 0,9\%$, $4,7 \pm 0,5\%$, $20,6 \pm 1,1\%$ — во II группе (различия статистически значимы для перечисленных показателей, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Начиная с третьих суток в перифокальных тканях вокруг Тахокомба происходило нарастание количества фибробластов до $28,2 \pm 2,4\%$, к седьмым суткам увеличивалась плотность соединительной ткани. В грануляционной

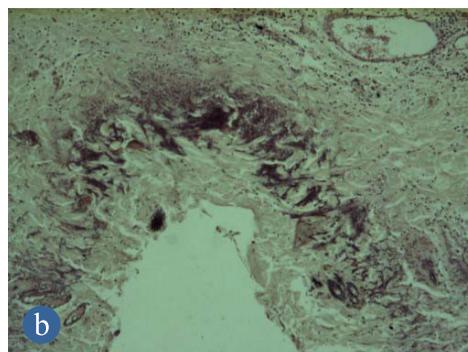
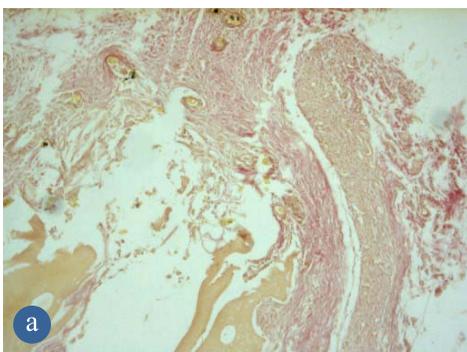


Рис 3. Микропрепараты тканей крыс на 14-е сутки эксперимента: **А** — ткани после имплантации Тахокомба; **В** — ткани с гемостатической губкой, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

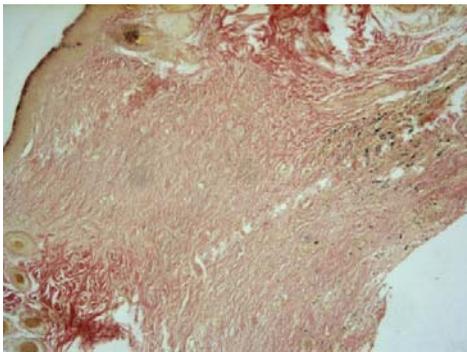


Рис. 4. 30-е сутки — фуксинофильные волокна, полностью заместившие зону воздействия, лизис Тахокомба; окраска пикрофуксином по Ван Гизону, $\times 100$

ткани выявлялись фуксинофильные пучки коллагеновых волокон, что свидетельствует о фиброзной трансформации.

На 30-е сутки отмечалась полная элиминация компонентов Тахокомба, замещение ее фуксинофильными волокнами с образованием зрелой соединительной ткани, при этом полиморфно-ядерной инфильтрации тканей не наблюдалось. Количество фибробластов и объемная плотность соединительных волокон в зоне рубца снижались до $68,1 \pm 4,6\%$ и $36,6 \pm 2,1\%$ соответственно (рис. 4).

На 60-е сутки после полной элиминации пластины Тахокомб отмечалось наличие плотного рубца, состоящего из зрелой соединительной ткани, характеризующегося полным отсутствием воспалительной клеточной инфильтрации с незначительным содержанием фибробластов — $25,6 \pm 2,7\%$ (рис. 5).

В то же время во II группе численное содержание фибробластов и плотность соединитель-

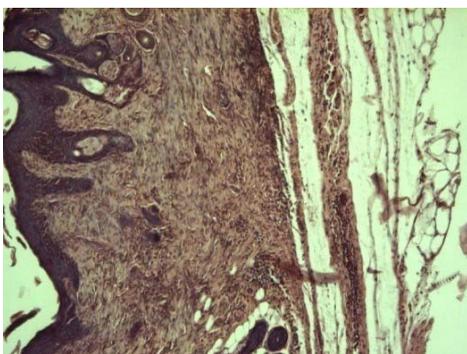


Рис. 5. 60-е сутки — плотная оформленная соединительная ткань на месте Тахокомба, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

ной ткани на 30-е сутки составляли $49,3 \pm 3,9\%$ и $51,1 \pm 2,5\%$.

На 14-х сутках в препаратах, содержащих гемостатическую губку, наблюдалось сохранение клеточной инфильтрации вокруг изучаемого материала, увеличение плотности соединительного компонента, при этом сохранялись элементы губки (рис. 6).

Полная элиминация гемостатической губки происходила на 30-е сутки, но в тканях при этом формировалось гранулематозное воспаление 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, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни) (рис. 7).

Таким образом, полученные данные морфологического и морфометрического исследований тканей после имплантации губки Тахокомб и гемостатической губки свидетельствуют о том, что при использовании Тахокомба, в отличие от гемостатической губки, в тканях подопытных крыс развивается слабая воспалительно-клеточная реакция, элиминация исследуемого материала происходит на 30-е сутки, с формированием зрелого соединительнотканного рубца к 60-м суткам. Полученные результаты позволили нам обосновать целесообразность использования Тахокомба в клинической практике при выполнении мастэктомии с лимфаденэктомией для профилактики длительной лимфореи.

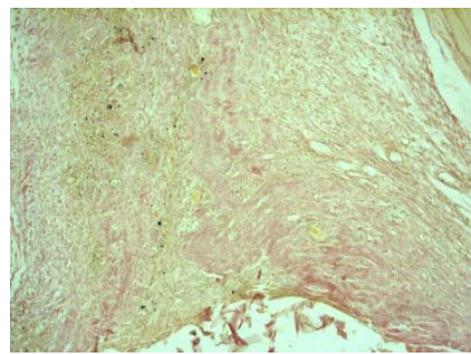


Рис. 6. 14-е сутки после имплантации гемостатической губки — обилие клеточных элементов среди слабоокрашенного фуксинофильного каркаса грануляций, окраска пикрофуксином по Ван Гизону, $\times 200$

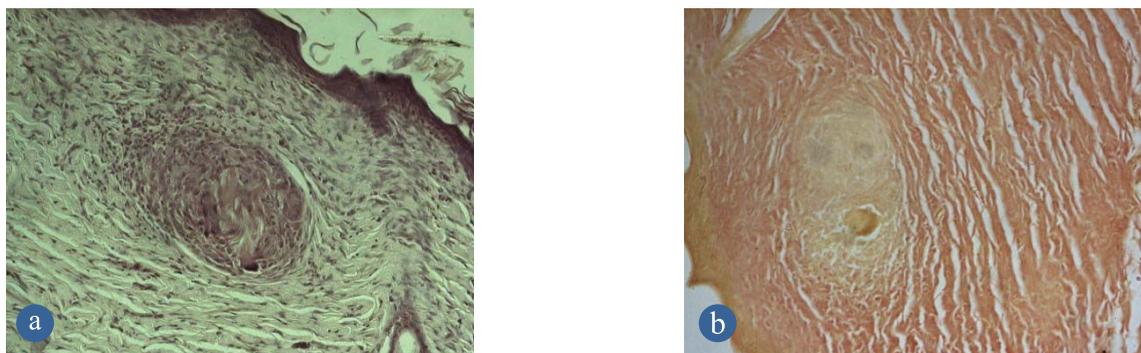


Рис. 7. 30-е сутки — отсутствие элементов гемостатической губки, эпителизация кожного покрова, в дерме — наличие гранулемы (гранулематозного воспаления); **А** — окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; **В** — среди коллагенового каркаса дермы гранулема; окраска пикрофуксином по Ван Гизону, $\times 200$

В клинической группе IA у больных раком молочной железы, оперированных по стандартной методике с дренированием послеоперационной раны редон-дренажом, длительность лимфорей составила $22,94 \pm 2,7$ дня, при этом общий объем выделенной лимфы составил $1005,48 \pm 47,3$ мл. Дренаж в этой группе пациенток был снят на $19,2 \pm 2,6$ суток. Закрытие образовавшегося дефекта тканей в результате лимфаденэктомии в подмышечно-подключичной области у пациенток клинической группы ПА пластиной Тахокомб позволило значительно сократить время вакуумного дренирования раны — до $12,3 \pm 1,8$ дней. Кроме того, объем лимфорей в этой группе больных составил $289,5 \pm 46,2$ мл (различия в группах IA и ПА статистически значимы для перечисленных показателей, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Выводы. Проведенное нами экспериментально-клиническое исследование показало высокую эффективность использования коллагеновой губки Тахокомб® для профилактики лимфорей у пациенток, оперированных по поводу рака молочной железы.

Имплантация Тахокомба в ткани не вызывает гранулематозного воспаления в них, полная элиминация препарата происходит в короткие сроки — до одного месяца, в отличие от стандартной гемостатической коллагеновой губки, выпускаемой заводом «Белкозин».

Полученные нами результаты исследования позволяют предположить эффективность использования губки Тахокомб и при других обширных хирургических вмешательствах, сопровождающихся лимфореей и капиллярным кровотечением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горский В.А., Шуркалин Б.К. Первый опыт закрытия перфоративного отверстия пилородуоденальной зоны препаратом «Тахокомб» без предварительного ушивания // Хирургия. — 1999. — № 8. — С. 60–61.
2. Горский В.А. Технические аспекты аппликации биополимера Тахокомб при операциях на органах брюшной полости / В.А. Горский // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. — 2001. — Т. 5. С. 43–46.
3. Бунатян А.Г., Завенян З.С., Багмет Н.Н. Проблемы гемостаза и герметизма при резекциях печени с использованием фибрин-коллагеновой субстанции // Хирургия. — 2003. — № 9. С. 18–23.
4. Скипенко О.Г., Шатверян Г.А. Применение покрытия «Тахокомб» при хирургических вмешательствах на печени и поджелудочной железе // Хирургия. — 1998. — № 1. — С. 11–14.
5. Santulli P. et al. Experience with TachoSil in obstetric and gynecologic surgery // Int J Gynaecol Obstet. — 2011 May;113(2):112–5.
6. Raiffort C. et al. Patient eligibility criteria for a surgical treatment that enhances tissue sealing by use of a medicated sponge: observational study ELITE. Springerplus. — 2013. Nov. 18;2:613.
7. Maggiori U.L.R. et al. Tachosil® application after laparoscopic myomectomy: a prospective randomized trial // Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics. — 2011; 23(4):147–154.
8. De Iaco et al. Fibrinogen and thrombin coated patch use on collagen support for lymphocele prevention after lumbar-aortic lymphadenectomy in gynecological neoplasms. Minerva Ginecol. — 2011. Oct; 63(5):471–3.

9. *Ghelardi A. et al.* Inguinofemoral lymphadenectomy in patients undergoing radical vulvectomy for vulvar cancer. A new patch is able to reduce lymphatic complications // *It. J. Gynaecol. Obstet.* — 2011, 23: №. 4.
10. *Buda A. et al.* The contribution of a collagen–fibrin 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. — Т. 197. — С. 156–158.
11. *Tinelli A. et al.* 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. — Т. 23. — № 5. — С. 956–963.
12. *Santulli P. et al.* Experience with TachoSil in obstetric and gynecologic surgery // *Int J Gynaecol Obstet.* — 2011. May;113(2):112–5.
13. *Navarro-Rodríguez E., Gómez-Luque I., Díaz-Jiménez N., Rioja-Torres P., Bascuñana-Estudillo G., Ruiz-Rabelo J.F., Ciria-Bru R., Álvarez-Benito M., Rufián-Peña S., Briceño-Delgado J.* Effectiveness of an absorbable fibrin sealant patch to reduce lymphocele formation after axillary lymphadenectomy for breast cancer: a matched-pair analysis // *Am J Surg.* — 2014. Nov; 208(5):824–30.
14. *Gianluca Di Monta et al.* Collagen sealant patch to reduce lymphatic drainage after lymph node dissection // *World Journal of Surgical Oncology.* Am J Surg 2012. 10:275.

АВТОРЫ

Митин Сергей Сергеевич, кандидат медицинских наук, заведующий хирургическим отделением МУЗ Сосновская ЦРБ Сосновского района Челябинской области, e-mail: klinika_chgma@mail.ru

Mitin Sergey Sergeevich, Ph.D., chief of surgical department, Central Regional Hospital, Chelyabinsk regions, Chelyabinsk, e-mail: klinika_chgma@mail.ru

Ануфриева Светлана Сергеевна, профессор кафедры факультетской хирургии Южно-Уральского государственного медицинского университета (ЮУГМУ), e-mail: mammolog@inbox.ru

Anufrieva Svetlana Sergeevna, M.D., Professor of faculty surgery, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: mammolog@inbox.ru

Куренков Евгений Леонидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной анатомии ЮУГМУ, e-mail: lechfak@chelsma.ru

Kurenkov Evgeny Leonidovich, M.D., Professor, Chief of standards anatomy department, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: lechfak@chelsma.ru

Климович Мария Ярославовна, врач-интерн, кафедра факультетской хирургии, врач ординатор ЮУГМУ, г. Челябинск
Klimovich Maria, doctor-intern, department of faculty surgery, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk