

© Коллектив авторов, 2006
УДК 617.58-002.44-08:576.3/.4

В.М.Седов¹, Д.Ю.Андреев¹, Т.Д.Смирнова², Б.А.Парамонов³, Т.Н.Енькина⁴,
А.А.Соминина², О.И.Киселев², Ю.Ю.Суисси¹, Л.В.Лебедев¹

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

¹Кафедра факультетской хирургии (зав. — проф. В.М.Седов) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, ²отдел клеточных культур (руков. — Т.Д. Смирнова) ГУ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН, ³кафедра пластической и эстетической хирургии (зав. — проф. С.Ф.Малахов) Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования, ⁴центр ультразвуковой диагностики заболеваний сосудов (руков. — Т.Н. Гныкина) ЦМСЧ № 122, Санкт-Петербург

Ключевые слова: трофические язвы, лечение, клеточная терапия.

Введение. Трофические язвы при хронической венозной недостаточности (ХВН) представляют собой сложную медико-социальную проблему. Заболевания, приводящие к развитию ХВН, — варикозная и посттромботическая болезни — весьма распространены [2, 4, 5]. Трофические язвы характеризуются крайне низкой склонностью к заживлению, частыми рецидивами, сложностью и дороговизной лечения. Они обрекают пациентов на длительные, часто многолетние страдания, сопровождаясь выраженным болевым синдромом.

Независимо от формы ХВН, в ее основе лежит венозная гипертензия, обусловленная клапанной недостаточностью перфорантных, глубоких и поверхностных вен. Венозная гипертензия приводит к нарушению микроциркуляции, тканевой гипоксии и активации лейкоцитов с выбросом ими лизосомальных ферментов. В результате значительно страдают трофика и защитные свойства кожи. При ее повреждении развивается некроз с массивным экссудативным процессом. В дальнейшем происходит быстрая бактериальная контаминация возникшей трофической язвы с прогрессированием воспаления и некротических процессов не только в коже, но и в глубже лежащих тканях [6, 7, 10].

С учетом патогенеза ХВН в основе лечения трофических язв должны быть действия, направленные на устранение или максимальное снижение флебогипертензии. Наиболее радикальными из них являются хирургические вмешательства, направленные на устранение горизонтального и вертикального рефлюксов и, в ряде случаев, на ликвидацию клапанной несостоятельности глубоких вен [9, 11].

Однако операции при активной трофической язве в условиях отека, индурации и воспаления кожи и подкожной клетчатки, близости инфицированной раны, во-первых, сложны технически, со-

провожаются значительной операционной травмой, а во-вторых, чреваты гнойными осложнениями и несостоятельностью швов. Появление видеоэндохирургической технологии ликвидации горизонтального рефлюкса (SEPS — Subfascial Endoscopic Perforant Surgery), к сожалению, также не решило проблему окончательно — частота рецидивов посттромботических трофических язв после SEPS высока [8]. Выполнение оперативного вмешательства после заживления трофических язв предпочтительно, но часто оказывается невозможным в связи с высокой толерантностью язв к известным методам консервативного лечения. Поэтому актуальной следует считать задачу разработки эффективных технологий в местном лечении трофических язв. К таковым можно отнести клеточную терапию, которая с успехом использовалась в лечении ожогов [1, 3].

Цель настоящего исследования — оценка эффективности использования культуры фибробластов плодов человека в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии.

Материалы и методы. Клеточная терапия с использованием культуры фибробластов применялась в лечении 23 больных с 50 трофическими язвами нижних конечностей (из них 13 — женщины, 10 — мужчины). Средний возраст больных — 53,2 года. Эти пациенты составили основную 1-ю группу. Причиной язв были посттромботическая болезнь у 16 пациентов и варикозная болезнь — у 7 больных. К началу лечения среднее время существования посттромботических трофических язв равнялось 7,5 года (от 6 мес до 15 лет), варикозных язв — 3,4 года (от 6 мес до 5 лет). Продолжительность же безуспешного лечения (промежутков времени, на протяжении которого язва ни разу не закрывалась) до начала нашего лечения составила соответственно в среднем 2 года (от 3 мес до 15 лет) и 1,3 года (от 2 мес до 5 лет). У 22 пациентов язвы располагались на одной нижней конечности, у одного — на обеих. Одиночные язвы встретились у 15 пациентов, множественные (от 2 до 7) — у 8. Средняя площадь варикозных трофических язв составила 2,4 см² (от 1 до 4,5 см²), посттромботических язв — 60 см² (от 6 до 1050 см²).

В контрольную 2-ю группу входили 25 больных с 53 трофическими язвами (15 — женщин, 10 — мужчин). Средний возраст больных — 52,4 года. Посттромботическая болезнь яви-

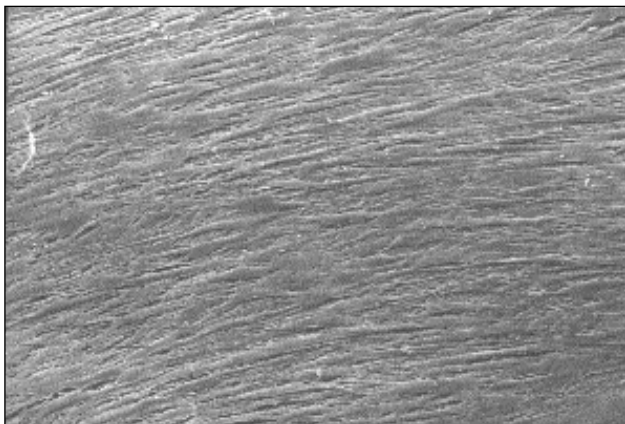


Рис. 1. Культура фибробластов плода человека на пленке «Фолидерм»™.

Сканирующая электронная микроскопия. Ув. 200.

лась причиной возникновения трофических язв у 18 пациентов, варикозная болезнь — у 7. Среднее время существования посттромботических трофических язв на момент начала лечения равнялось 6,9 года (от 4 мес до 15 лет), варикозных язв — 3,1 года (от 3 мес до 4 лет). Продолжительность безуспешного лечения составила соответственно в среднем 2,5 (от 2 мес до 15 лет) и 1,2 года (от 1,5 мес до 4 лет). У 24 пациентов язвы располагались на одной нижней конечности, у одного — на обеих. Одиночные язвы встретились у 16 пациентов, множественные (от 2 до 8) — у 9. Средняя площадь варикозных трофических язв составила 2,6 см² (от 0,8 до 5,0 см²), посттромботических язв — 52 см² (от 5 до 980 см²). Преимущественной локализацией трофических язв в обеих группах была внутренняя поверхность голени (37 — в 1-й группе и 45 — во 2-й). В единичных случаях язвы располагались на наружной, передней и задней поверхностях голени.

Определение площади поверхности трофической язвы осуществляли следующим образом. Стерильная прозрачная целлофановая пленка накладывалась на язву и маркером обводились ее контуры. Затем целлофан переносился на лист миллиметровой бумаги и рассчитывалась площадь язвенной поверхности.

Всем пациентам выполнялось ультразвуковое дуплексное сканирование вен (а при необходимости и артерий) нижних конечностей.

Методика лечения язв на I (гнойно-некротической) и II (грануляционной) стадиях была одинаковой в обеих группах. Она включала использование мазей на водорастворимой основе (левосин, левомеколь, бетадин, солдер и др.) или эмульсий первого рода («масло в воде») — дермазин, аргосульфат. При необходимости на I стадии раневого процесса применялись ферментные препараты (ируксол, ируксол-моно, колладиосорб). У всех больных использовалась компрессионная терапия с помощью биндажа, формируемого из бинтов короткой степени растяжимости (иногда в сочетании с бинтами средней степени растяжимости). Уровень бинтования (от основания пальцев или от голеностопного сустава до колена или до паха), техника наложения биндажа, степень компрессии — зависели от формы поражения венозной и артериальной систем у данного конкретного больного.

На стадии эпителизации в основной группе — после получения информированного согласия пациентов — применялась культура человеческих фибробластов, выращенных на раневом покрытии «Фолидерм»™. Использовались клетки штамма 11 00/14, выделенные из легких человеческого плода в НИИ гриппа РАМН. Клетки 6–30 пассажей выращивались в условиях CO₂-инкубатора на раневом покрытии «Фоли-



Рис. 2. Пересадка культуры фибробластов на язвенную поверхность.

дерм»™ (ООО «Фолиум», Санкт-Петербург) до образования слитного монослоя (рис. 1). Пересадка клеток на рану осуществлялась со строгим соблюдением правил асептики в инвертированном положении монослоя, когда клетки непосредственно контактируют с поверхностью язвы (рис. 2). В зависимости от размеров язвенного поражения либо производили смену пленки с клетками каждые 5–10 дней, либо оставляли клетки до полного заживления язвы. При каждой смене старую пленку забирали для гистологического (в том числе электронно-микроскопического) исследования.

В контрольной группе на стадии эпителизации использовали современные альгинатные, коллагеновые, гидрогелевые, полиуретановые и гидроколлоидные раневые покрытия Супрасорб — Супрасорб А, Супрасорб С, Супрасорб G, Супрасорб F и Супрасорб Н. В связи с выраженным экссудативным процессом лечение начинали с комбинированной альгинатно-гидроколлоидной повязки (Супрасорб А + Супрасорб Н), которая обладает наибольшей сорбционной способностью. Смену повязки производили после полного растворения альгината. Раневые покрытия Супрасорб С, Супрасорб F и Супрасорб G применяли, если максимальный размер язвы не уменьшался на протяжении 2–3 перевязок.

При обширных трофических язвах и согласии пациента производили аутодермопластику (аутодермопластику перфорированным расщепленным лоскутом, микроаутодермопластику, метод «почтовых марок» или их сочетания). Донорскими зонами служили внутренняя и наружная поверхности бедер. Обезболивание осуществляли путем электрофореза смеси Панферова (0,5% раствор новокаина с адреналином) или с помощью инфильтрационной анестезии. Электродерматомом срезали расщепленный лоскут кожи толщиной 0,2–0,4 мм необходимой площади, который затем перфорировали и расправляли на язвенной поверхности. При аутодермопластике «марочным» методом лоскут приклеивали к вошеной бумаге, затем нарезали на «марки» размером приблизительно 0,5×0,5 см, которые накладывали на язву. Микроаутодермопластику выполняли путем нарезания исходного расщепленного лоскута на фрагменты размером 1×1 мм и их распределением на язве на расстоянии 10–15 мм друг от друга. Последний способ позволяет достичь коэффициента пластики 1:10 и более. Пересаженные трансплантаты в основной группе покрывали пленкой «Фолидерм» с фибробластами, а в контрольной — альгинатным и гидроколлоидным раневым покрытием (Супрасорб А и Супрасорб Н). Также поступали и с донорскими участками. Пациенту назначался строгий постельный режим на 5–7 сут. Вставать разрешали лишь при крайней необходимости, категорически запрещая пациенту при ходьбе сти-

бать ногу в голеностопном суставе. Цель — предотвратить сдвигание пересаженных кожных трансплантатов и разрушение врастающих в них кровеносных сосудов.

Системная антибактериальная терапия проводилась лишь с целью профилактики гнойно-септических послеоперационных осложнений и заключалась во внутримышечном или внутривенном введении 1 г клафорана перед аутодермопластикой и после нее.

Динамику заживления язвы оценивали путем измерения ее максимального размера при каждой перевязке. Этот простой способ позволяет адекватно оценить скорость заживления язвы, которая выражается в уменьшении максимального размера язвы за сутки. Кроме того, при каждой перевязке производили фотографирование язвенной поверхности на цифровую камеру («Canon-350D»).

Критерием признания методики неэффективной и прекращения ее использования для лечения конкретной язвы служило отсутствие уменьшения максимального размера язвы в течение 2 нед.

После заживления трофических язв пациентам подбирали компрессионный трикотаж. Компрессионный класс и вид трикотажа назначали индивидуально в зависимости от варианта поражения сосудистой системы нижних конечностей. Больным с зажившими варикозными язвами и пациентам с посттромботическими язвами, у которых при дуплексном сканировании была выявлена реканализация глубоких вен при выраженной несостоятельности подкожных и перфорантных вен, рекомендовали оперативное лечение в плановом порядке.

Через 2 и 4 нед после заживления язв выполняли контрольные обследования пациентов. В дальнейшем на протяжении 6 мес контрольные осмотры проводились по необходимости.

Результаты и обсуждение. Время достижения стадии эпителизации язвенной поверхности было одинаковым в обеих группах и в среднем составило 1,3 нед (от 5 до 15 дней). К этому времени вся язвенная поверхность была покрыта чистыми ярко-красными сочными грануляциями с высокой адгезивностью.

Формирование слитного монослоя фибробластов наблюдалось через 2–7 сут после заселения клеток на раневое покрытие «Фолидерм».

В 1-й группе пациентов аппликация фибробластов на язву резко снижала раневую экссудацию. На следующие сутки после трансплантации под пленкой скапливалось умеренное количество экссудата. С 3-х суток наблюдались краевое подсыхание, активная краевая эпителизация. При небольших (до 3 см²) размерах язвы образовывался струп над всей площадью язвенной поверхности, что происходило на 4–10-е сутки после пересадки клеток. В этом случае дальнейших перевязок не требовалось. Если площадь язвы превышала 3 см², струп не покрывал всю поверхность. Количество экссудата под пленкой не увеличивалось вплоть до 7–10-х суток после пересадки, но затем было необходимо выполнить повторную пересадку, сменив старую пленку с клетками на новую. В противном случае экссудация усиливалась, и краевая эпителизация прекращалась. Средняя частота перевязок в серии составила 1 в 7,6 сут.

Под раневым покрытием с фибробластами постоянно наблюдалось формирование (уже с 3-х суток после первой пересадки) толстой (толщиной 1–2 мм) фибриновой пленки. Она легко отделялась от подлежащей грануляционной ткани и замещалась быстро растущим с краев эпителием. Скорость уменьшения максимального размера язв равнялась в среднем 1,8 мм/сут.

Исследование снятых с трофических язв раневых покрытий с фибробластами показало сохранение клеток на пленке, однако их количество было меньше исходного. Если к 5-м суткам после пересадки число клеток на пленке равнялось примерно 70–80% от исходного, то к 10-му дню на пленке оставалось лишь 30–40% пересаженных клеток. Фибробласты теряли свою веретенообразную форму, приобретали округлые очертания (рис. 3).

Аутодермопластика была выполнена у 6 пациентов с обширными трофическими язвами (10 трофических язв): у 4 (8 трофических язв) — аутодермопластика расщепленным лоскутом, у 1 (одна циркулярная трофическая язва) — аутодермопластика расщепленным лоскутом + микроаутодермопластика, у 1 (1 язва) — аутодермопластика по методу Яновича—Чайнского. Первая перевязка после аутодермопластики выполнялась на 5–7-е сутки. При этом в случае аутодермопластики расщепленным лоскутом производили лишь смену марлевых салфеток над пленками с фибробластами, а при микроаутодермопластике меняли и пленки с клетками. Скорость разрастания пересаженных микроаутоотрансплантатов кожи составила в среднем 2,2 мм/сут. Ни у одного из пациентов после операции не наблюдалось некроза пересаженной кожи. На донорской зоне в 1-е сутки после операции меняли марлевые салфетки над пленками с клетками, вторую перевязку выполняли на 5–7-е сутки. Восстановление эпителия донорской зоны наблюдалось в среднем на 12-й день после операции.

Заживление трофических язв было достигнуто у всех (100%) пациентов. Средний срок заживления составил 11 дней для варикозных и 22,5 дня — для посттромботических язв (рис. 4). Четверем из семи пациентов с зажившими варикозными язвами была выполнена комбинированная флебэктомия в плановом порядке (через 2–8 нед после заживления язв). Все операции прошли без осложнений. На протяжении всего срока наблюдения (6 мес) рецидив трофической язвы имел место лишь у одного пациента (посттромботическая болезнь) и был связан с прекращением использования компрессионного трикотажа.

В контрольной группе в зависимости от степени экссудации полное растворение альгината наблюдалось на 1–5-е сутки после перевязки, как только он начинал вытекать из-под гидро-

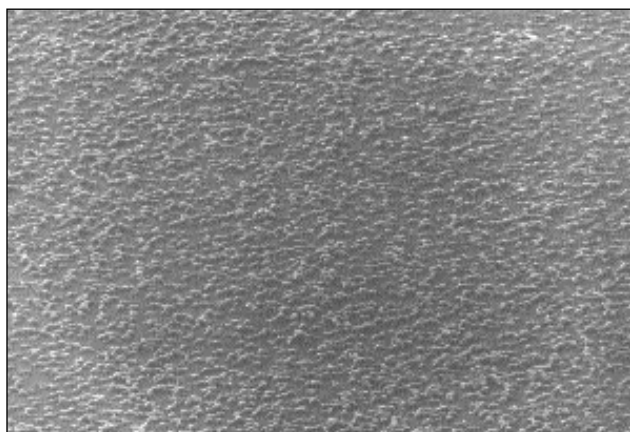


Рис. 3. Фибробласты на пленке «Фолидерм»™ через 5 сут после трансплантации.

Сканирующая электронная микроскопия. Ув. 200.

коллоидного покрытия или незадолго до этого выполняли смену раневых покрытий. Необходимая частота перевязок составила в среднем 1 в 2,7 дня. В отличие от основной группы у этих пациентов практически никогда не происходило образования фибриновой пленки на грануляциях. Скорость уменьшения максимального размера язв равнялась в среднем 0,3 мм/сут.

Аутодермопластика была выполнена у 7 пациентов с обширными трофическими язвами (11 трофических язв), у 5 (8 трофических язв) — аутодермопластика расщепленным лоскутом, у 2 (3 язвы) — микроаутодермопластика. Первая перевязка после аутодермопластики выполнялась на 5–7-е сутки. При этом полностью меняли раневые покрытия над пересаженной кожей. Лишь у одного пациента после аутодермопластики расщепленным лоскутом возник краевой некроз (порядка 10% площади) пересаженной кожи. Выполненная некрэктомия практически не повлияла на заживление язвы. Скорость разрастания микроаутоотрансплантатов составила в

среднем 0,9 мм/сут. На донорской зоне раневые покрытия меняли в 1-е сутки после операции, а затем — по мере необходимости (в среднем 1 раз в 2,5 сут). Восстановление эпителия донорской зоны наблюдалось в среднем на 19-й день после операции.

Заживление варикозных трофических язв в контрольной группе было достигнуто у 6 из 7 пациентов, посттромботических — у 14 из 18 больных. У остальных пяти пациентов после первоначального уменьшения площади язвенной поверхности на 10–45% процесс заживления язвы прекращался. Язвы начинали увеличиваться в размерах, заметно усиливалась экссудация, растворившийся альгинат приобретал геморрагический характер. Смена альгинатно-гидроколлоидной повязки на коллагеновые, полиуретановые и гидроколлоидные раневые покрытия в этих случаях не привела к положительному эффекту. Интересно, что у всех 5 больных удалось добиться заживления язв с помощью клеточной терапии в течение 1–3 нед после прекращения лечения раневыми покрытиями Супрасорб (результаты не вошли в данные по основной группе пациентов). Средний срок заживления составил 3,6 и 3,9 мес для варикозных и посттромботических язв соответственно. Трое из шести пациентов с зажившими варикозными язвами были оперированы в плановом порядке через 1–6 нед после заживления язв (комбинированная флебэктомия). Все операции прошли без осложнений. Рецидива трофической язвы не было ни у одного больного.

Идея использовать выращенные в культуре фибробласты для заживления ран не нова. Имеется значительный положительный опыт их применения у больных с ожогами [1, 3].

Значительное ускорение эпителизации при трансплантации фибробластов связывают с выделением этими клетками компонентов внекле-



Рис. 4. Пациентка М., 66 лет. Посттромботическая болезнь, циркулярная трофическая язва левой голени. Время существования язвы 15 лет.

а — до лечения; б — через 1,5 мес после клеточной терапии и аутодермопластики.

точного матрикса (коллагены 1-, 2-, 3-го и 4-го типа, ламинин, нидоген, фибронектин и др.) и факторов роста — регуляторных пептидов, обладающих способностью активировать пролиферацию клеток. К числу последних относится, например, β -FGF — основной фактор роста фибробластов, стимулирующий пролиферацию всех типов клеток в ране и продукцию ими компонентов внеклеточного матрикса.

Культивирование и трансплантация выращенных *in vitro* фибробластов эффективны на стерильном раневом покрытии «Фолидерм»TM. Оно представляет собой тонкую пленку из полиэтилентерефталата со сквозными порами диаметром 0,01–0,03 мкм и плотностью пор 10^3 – 10^9 на 1 см². Поры такого диаметра обеспечивают адекватный влаго- и газообмен раневой поверхности и, в то же время, являются непроницаемыми для бактерий. Поэтому данная подложка обеспечивает защиту ран и пересаженной клеточной культуры от инфицирования. Другое немаловажное свойство пленки — ее относительная прозрачность — позволяет легко наблюдать за процессом роста клеток на ней в инвертированный световой микроскоп, а после пересадки клеток — следить за ходом раневого процесса. Кроме того, обладая электростатическими свойствами, при трансплантации «Фолидерм»TM «прилипает» к раневой поверхности, моделируя неровности ее рельефа.

Судьба пересаженных фибробластов остается неясной. Нами установлено постепенное уменьшение их количества на пленке. Возможно, что клетки мигрируют с пленки на поверхность трофической язвы, принимая участие в формировании толстой фибриновой пленки, которая постоянно встречалась под пересаженными клетками. Вероятна и другая версия — контактируя с раневой поверхностью, клетки постепенно теряют жизнеспособность и гибнут, что и обуславливает необходимость периодической смены трансплантатов.

Выводы. 1. Применение культуры фибробластов плодов человека, выращенных на раневом покрытии «Фолидерм»TM, является высокоэффективным методом лечения венозных трофических язв.

2. Методика технически проста, позволяет значительно уменьшить частоту перевязок и улучшает результаты аутодермопластики.

3. Разработанная технология превосходит по своей эффективности использование современных альгинатных, коллагеновых, гидрогелевых и гидроколлоидных раневых покрытий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Глущенко Е.В., Заец Т.Л., Серов Г.Г. Выбор оптимальных сроков трансплантации культивированных фибробластов на ожоговую рану // Пластическая хирургия при ожогах и

ранах: Материалы международного симпозиума.—М., 1994.—С. 21–22.

2. Орловский П.И., Гриценко В.В., Мельцова А.Ж., Балакова С.П. Трофические язвы нижних конечностей.—СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2004.—77 с.
3. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги: Руководство для врачей.—СПб.: СпецЛит, 2000.—480 с.
4. Савельев В.С., Гологорский В.А., Кириенко А.И. и др. Флебология: Руководство для врачей / Под ред. В.С.Савельева.—М.: Медицина, 2001.—664 с.
5. Baker S.R., Stacey M.C., Jopp-McKay A.G. et al. Epidemiology of chronic venous ulcers // Brit. J. Surg.—1991.—Vol. 78.—P. 864–867.
6. Бауэрзакс Ж., Флеминг И., Буссе Р. Патофизиология хронической венозной недостаточности // Флебология.—1998.—№ 7.—С. 1–7.
7. Dormandy J.A. Pathophysiology of venous leg ulceration: an update // Angiology.—1997.—Vol. 48.—P. 71–75.
8. Gloviczki P., Bergan J.J., Rhodes J.M. et al. Mid-term results of endoscopic perforator vein interruption for chronic venous insufficiency: lessons learned from the North American subfascial endoscopic perforator surgery registry. The North American Study Group // J. Vasc. Surg.—1999.—Vol. 29.—P. 489–502.
9. Masuda E.M., Kistner R.L. Long-term results of venous valve reconstruction: a four- to twenty-one-year follow-up // J. Vasc. Surg.—1994.—Vol. 19.—P. 391–403.
10. Nelzen O., Bergqvist D., Lindhagen A. The prevalence of chronic lower-limb ulceration has been underestimated: results of a validate population questionnaire // Brit. J. Surg.—1996.—Vol. 83.—P. 255–258.
11. Raju S., Hardy J.D. Technical options in venous valve reconstructions // Amer. J. Surg.—1997.—Vol. 173.—P. 301–307.

Поступила в редакцию 30.11.2005 г.

V.M.Sedov, D.Yu.Andreev, T.D.Smirnova,
B.A.Paramonov, T.N.Enkina, A.A.Sominina,
O.I.Kiselev, Yu.Yu.Suissi, L.V.Lebedev

CELL THERAPY IN TREATMENT OF TROPHIC ULCERS OF LOWER EXTREMITIES

The aim of the work was to study the effectiveness of using human embryo fibroblast culture in complex treatment of trophic ulcers of venous etiology in 23 patients with trophic ulcers of lower extremities. The cause of the appearance of ulcers was postthrombophlebitic disease in 16 patients and varicose disease in 7 patients. A control group consisted of 25 patients (postthrombophlebitic disease in 18 patients and varicose disease in 7 patients). The human embryo cell culture grown on the wound cover «Foliderm»tm was used at the stage of epithelization in the main group, while in the control group the modern alginate, collagen, hydrogel, polyurethane and hydrocolloid covers Suprosorb — Suprosorb A, Suprosorb C, Suprosorb G, Suprosorb F and Suprosorb H were used. Healing of the varicose trophic ulcers in the control group was achieved in 86% of patients, of postthrombophlebitic — in 78% of patients.

The average period of healing was 3.6 and 3.9 months respectively. Healing of trophic ulcers in the main group took place in 100% of patients. The average period of healing was 1.5 week for varicose and 3.2 weeks for postthrombophlebitic ulcers. The cell therapy was shown to be a highly effective method in treatment of venous trophic ulcers.