

© Коллектив авторов, 2007
УДК 617.58-002.44-08:576.3/4

А.Ж.Мельцова, В.В.Гриценко, П.И.Орловский, В.В.Томсон, В.В.Сабельников,
Е.К.Шулепова, А.И.Прокопец, Г.П.Пинаев, М.И.Блинова, Н.М.Юдинцева

ПРИМЕНЕНИЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ ВЕНОЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Кафедра госпитальной хирургии № 2 ГУО ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова Росздрава», НИЦ «СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова Росздрава», отделение хирургии сосудов Российского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена, отдел клеточных культур Института цитологии РАН

Ключевые слова: трофические язвы, лечение, аллогенные фибробласты, дермальный эквивалент.

Введение. Реабилитация пациентов с трофическими язвами (ТЯ) венозной этиологии — сложная медицинская и социальная проблема, несмотря на богатую историю разработки и внедрения в клиническую практику огромного количества консервативных и оперативных методов их лечения. Это связано с широким распространением данной патологии (страдают около 2% взрослого населения), длительным прогрессирующим течением заболевания и сравнительно высокой частотой возникновения рецидивов [1]. Основные трудности в лечении данной патологии обусловлены тем, что возникновение язвенного дефекта является результатом сложного и длительного процесса повреждения мягких тканей, в основе которого лежат развивающиеся в них на почве хронической венозной недостаточности стойкие нарушения микроциркуляции и аэробного метаболизма. Проводимое с учетом этиопатогенетических факторов лечение ТЯ поэтому предусматривает комплексный подход, включающий общую терапию, местное комбинированное лечение и хирургическую коррекцию гемодинамических расстройств, как основную причину развития трофических нарушений [2, 6, 7]. Хирургическая коррекция гемодинамических нарушений является основным, заключительным этапом лечения ТЯ, но из-за высокого риска развития гнойно-септических осложнений принципиально должна быть выполнена после заживления трофического дефекта. В связи с этим представляется весьма актуальным внедрение в клиническую практи-

ку эффективных методов лечения ТЯ, реально сокращающих сроки предоперационной подготовки больных, снижающих риск развития послеоперационных осложнений и повышающих эффективность проводимого больным с ТЯ венозной этиологии комплексного лечения.

Для ускорения заживления ТЯ нами использован активно развивающийся в последнее десятилетие метод клеточной терапии, основанный на использовании культивируемых *in vitro* фибробластов. Проведенные в этой области исследования показали, что культивированные *in vitro* фибробласты, хорошо себя зарекомендовавшие первоначально в комбустиологии для лечения ожоговых ран [3, 4], имеют хорошие перспективы применения в лечении ТЯ, характеризующихся резким нарушением метаболизма тканей в области язвенного дефекта [5]. Это, в свою очередь, послужило основанием к проведению дальнейших исследований, направленных не только на изучение происходящих в тканях под воздействием трансплантированных клеток физиологических процессов (репаративная активность тканей, скорость репаративных процессов), но и создания системы контроля и регуляции этих процессов для получения наиболее благоприятных результатов в каждом конкретном случае.

Цель настоящего исследования — изучение некоторых физиологических механизмов, оказывающих положительное влияние на заживление кожных ран под воздействием дермальных фибробластов в эксперименте, а также оценка эффективности клинического применения трансплантации дермальных фибробластов в комплексном лечении больных с ТЯ венозной этиологии.

Материалы и методы. В нашем исследовании был использован комплексный биотехнологический продукт — дермальный эквивалент (ДЭ), состоящий из аллогенных дермальных фибробластов человека, заключенных в коллагеновый гель. Культивирование фибробластов человека и приготовление из них ДЭ осуществлялось в отделе клеточных культур Института цитологии РАН. Источником получения дермальных фибробластов являлись ткани кожи, полученные при выполнении пластических операций. Культивирование фибробластов осуществлялось в питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки коров в течение 2–8 сут с периодической сменой среды. Для приготовления ДЭ использован коллаген I типа.

Экспериментальная часть работы была выполнена на базе НИЦ «СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова Росздрава». Эксперимент включал 45 самцов крыс линии Wister, все животные были разделены на две группы — основную (30 животных) и контрольную (15 животных). У животных обеих групп создавалась выполненная по оригинальной методике экспериментальная модель длительно незаживающей кожной раны. Под ингаляционным эфирным наркозом у крыс по вертебральной линии спины иссекался полнослойный кожный лоскут. Иссечение кожи и подкожной клетчатки производилось до фасции. Для предотвращения контракции раны и отграничения краевой эпителизации по периметру раны подшивали полихлорвиниловое кольцо диаметром 3,5 см. Кольцо фиксировали к краям раны на всю толщину кожи, а в дно раны для создания участка эпителизации подшивали аутодермотрансплантат. Животным основной группы в дно раны пересаживали также аллогенные дермальные фибробласты в коллагеновом геле, приготовленные по описанной методике. У животных контрольной группы раны оставляли без воздействия лечебных препаратов.

Сроки наблюдения животных в эксперименте составили 6,9 и 14 сут. После выведения животных ингаляцией паров эфира выполнялся забор биоптата дна кожной раны — иссекалось дно раны на всю толщину, до фасции. Производилось биохимическое исследование грануляционной ткани (ГТ) ран животных основной и контрольной группы, для определения содержания в ГТ уровня нуклеиновых кислот и аминокислот. Проводилась световая микроскопия срезов тканей экспериментальной раны для оценки гистологической структуры. Изучалась зона краевой эпителизации трансплантата, оценивались структура новообразованного эпидермиса и структура ГТ, в том числе морфометрические исследования. Исследованию подвергали ГТ, взятую на 6-е и 9-е сутки. В каждом препарате морфометрия производилась в 5 полях зрения. В каждом поле зрения проводили подсчет лимфоцитов, лейкоцитов, плазматических клеток, макрофагов, фибробластов и кровеносных сосудов. По данным морфометрии были построены вариационные ряды.

В клиническое исследование были включены 103 больных с ТЯ нижних конечностей венозной этиологии, которые находились на лечении в клинике госпитальной хирургии № 2 «СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова Росздрава» (58 больных) и отделении хирургии сосудов РосНИИТО им. Р.Р.Вредена (45 больных) за период с 1999 по 2005 г. Среди них были 72 пациента с варикозной болезнью (ВБ) и 31 пациент с посттромботической болезнью (ПТБ). Средний возраст больных составил $(63 \pm 5,8)$ года. Лечение больных, находящихся в обоих лечебных учреждениях, было однотипным и не имело существенных отличий.

Анамнестически у больных наблюдалось длительное прогрессирование симптомов хронической венозной недостаточности с формированием к моменту поступления в стационар стойких изменений мягких тканей голеней (индурация, гиперпигментация) и язвенного дефекта (VI клинический класс классификации Объединенного совета сосудистых хирургов СЕАР, 1994). Длительность существования язвенного дефекта кожи колебалась от 2 мес до 8 лет. Наряду с общеклиническими обследованиями, всем больным проводилось ультразвуковое дуплексное исследование вен нижних конечностей для оценки гемодинамических нарушений.

В зависимости от использованного комбинированного местного метода лечения все больные были разделены на две сопоставимые по возрастному и половому составу группы — основную и контрольную, отобранные методом случайной выборки. В основную группу (56 пациентов) вошли 42 больных с ВБ и 14 с посттромботической болезнью (ПТБ). Для заживления трофической язвы больным, составившим основную группу, применялась пересадка на язвенный дефект аллогенных дермальных фибробластов.

После предварительной подготовки ТЯ, направленной на купирование явлений острого воспаления и уменьшения микробного загрязнения, больным основной группы проводилась пересадка ДЭ. Площадь необходимого для пересадки ДЭ определялась соответственно размерам язвенного дефекта. Непосредственно пересадка осуществлялась в асептических условиях с наложением влажно-высыхающей защитной повязки над дефектом, обеспечивающей оптимальные условия для трансплантированных клеток. Предварительно вокруг дефекта накладывался валик, препятствующий соприкосновению язвенной поверхности и повязки. Для предотвращения смещения ДЭ больные соблюдали постельный режим в течение 6–8 ч после пересадки. Первые 2 сут перевязки не производились, в дальнейшем перевязки осуществлялись в максимально щадящем для язвенного дефекта режиме, без дополнительного применения лекарственных препаратов.

В контрольную группу вошли 47 больных, среди которых — 30 пациентов с ВБ, 17 — с ПТБ. Лечение больных, составивших контрольную группу, проводилось по традиционно используемым методикам, вклю-

чая применение современных лекарственных препаратов и раневых покрытий.

Кроме того, в комплексном лечении пациентов обеих групп, наряду с местной терапией, применялась системная лекарственная терапия, направленная на улучшение микроциркуляции, реологических свойств крови и тканевого обмена. Всем пациентам подбиралась адекватная компрессионная терапия, а также применялись физиотерапевтические методы лечения.

Для изучения эффективности лечения проводились оценка состояния язвенного дефекта и динамика течения язвенного процесса в обеих группах. В оценке трофической язвы учитывался характер ГТ в дне язвы (цвет, зернистость, налеты), краевая и очаговая эпителизации, наличие и характер отделяемого из язвы. Площадь трофического дефекта определялась методом контактной планиметрии, с учетом краевой и очаговой эпителизации. Кроме оценки непосредственно дефекта, учитывалось состояние окружающих тканей (отёк, гиперемия, мацерация).

Основными сравнительными критериями заживления были выбраны сроки эпителизации и скорость эпителизации. Скорость эпителизации рассчитывалась по формуле $S = S_n/t$, где S — начальная площадь язвы до лечения, S_n — площадь при последующем измерении, t — число дней между измерениями [1].

Результаты и обсуждение. Анализируя результаты исследования биоптатов экспериментальной раны у крыс, следует отметить, что раневой процесс в обеих группах протекал однотипно в соответствии стадиям заживления кожных ран.

Поскольку формирование и созревание грануляционной ткани является одним из основных звеньев процесса заживления кожных ран, а также то, что именно фибробласты играют ключевую роль в этом процессе, было выполнено морфометрическое исследование структуры грануляционной ткани.

Анализ данных морфометрического исследования ГТ уже к 6-м суткам наблюдения выявил в препаратах, взятых из раны в основной группе животных, достоверно ($p < 0,05$) большее количество фибробластов и кровеносных сосудов и достоверно меньшее количество лейкоцитов, лимфоцитов, чем в контрольной. Такое изменение морфометрических параметров свидетельствовало о преобладании в основной группе признаков, характерных для фазы репарации, над признаками фазы воспаления, в сравнении с контрольной группой, где это соотношение носило противоположенный характер. Таким образом, под действием ДЭ смена фаз течения раневого процесса

в основной группе происходила раньше, чем в контрольной. Аналогичное изменение морфометрических параметров наблюдалось и при исследовании срезов биоптатов, полученных на 9-е сутки наблюдения.

Полученные результаты дали нам основание считать, что аллогенные клетки сохраняли жизнеспособность в ране реципиента и активно включались в раневой процесс, выполняя свойственные для этих клеток в норме функции. В пользу этого свидетельствовали также результаты исследования уровня нуклеиновых кислот и аминокислот, выявившие достоверное повышение их содержания в ГТ животных основной группы, что дает основание говорить о повышении уровня синтетической активности в ГТ в ране у представителей основной группы животных по сравнению с контрольной. Найденные различия можно объяснить сохранением синтетической функции аллогенных фибробластов в ране реципиента и их участием в формировании ГТ.

Таким образом, надо полагать, что участие аллогенных фибробластов в образовании и созревании ГТ способствует ускорению этого процесса и, следовательно, более быстрому наступлению следующей фазы — эпителизации. Это было зафиксировано также по результатам изучения новообразованного эпителия при микроскопии полученных гистологических срезов биоптатов экспериментальных ран в основной и контрольной группе животных. Так, ширина зоны краевой эпителизации из трансплантата в основной группе была достоверно выше, чем в контрольной группе, особенно на последнем сроке наблюдения (табл. 1).

Таблица 1

**Ширина зоны краевой эпителизации (мм)
трансплантата в экспериментальной ране
в разные сроки наблюдения ($M \pm m$)**

Сроки наблюдения, сут	Контрольная группа	Основная группа
6-е	1,24±0,37	1,60±0,08
9-е	1,9±0,6	2,6±0,3
14-е	3,0±0,5	5,10±0,46

Кроме того, структура новообразованного эпидермиса у животных в основной группе имела больше признаков зрелости, чем в контрольной группе. Это нашло свое выражение в том, что у животных основной группы на 14-е сутки эпидермис содержал больше слоев клеток и был в большей степени дифференцирован, в нем также было

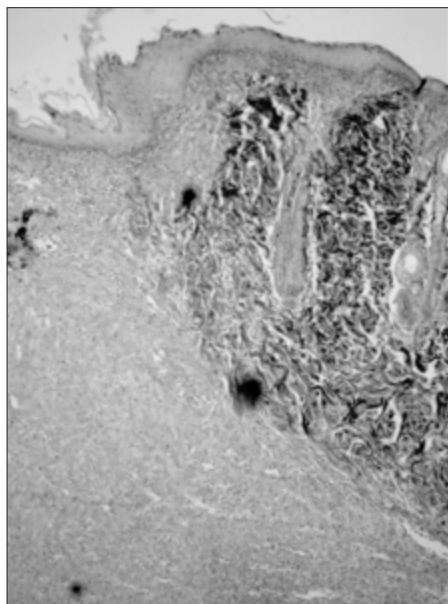


Рис. 1. Край трансплантата в ране животного основной группы на 14-е сутки после операции.

Окраска резорцин-фуксином Вейгарта. Ув.160.

отмечено в эти сроки наличие рогового слоя (рис. 1).

Ускорение процесса эпителизации раны в основной группе животных мы связываем с функциональной активностью аллогенных фибробластов, как известно, влияющих на скорость образования и созревания ГТ, но и, вероятно, как результат непосредственного действия фибробластов на эпидермис, посредством выделения ими факторов роста.

Результаты, полученные при пересадке ДЭ в экспериментальном исследовании, нашли свое отражение в клинике у больных при использовании ДЭ в лечении ТЯ венозной этиологии. При использовании аллогенных дермальных фибробластов человека у больных основной группы отмечались существенные особенности в течении репаративных процессов в язвенном дефекте по сравнению с больными контрольной группы. Они проявлялись уже на 2-е сутки после пересадки ДЭ и зависели от площади язвенного дефекта.

В зависимости от площади дефекта наиболее значимые различия в заживлении ТЯ отмечались между дефектами малой площади (до 12 см²) и ТЯ большей площади (от 12 см² до 68 см²). В случаях дефектов малой площади в большинстве случаев коллагеновый гель с включенными фибробластами ко 2-м суткам преобразовывался в неплотную пленку либо тонкий струп над всей поверхностью ТЯ. В дальнейшем под этим новообразованным струпом или пленкой шла активная краевая эпите-

лизация, визуально отмеченная со 2-х суток после пересадки аллогенных фибробластов. В течение первых 3 сут поверхностный струп и новообразованный эпителий отличались низкой устойчивостью к травматизации, что требовало бережного и атравматичного выполнения перевязок. В случаях дефектов малой площади повторной пересадки ДЭ, как и применения дополнительных лекарственных препаратов, не требовалось.

В случаях наличия трофических дефектов более 12 см² образования струпа не наблюдалось и все видимые изменения вначале определялись изменениями структуры ГТ. Вне зависимости от исходного состояния грануляционной ткани дна ТЯ после пересадки ДЭ отмечалось изменение ГТ с формированием структуры, оптимальной для распространения эпителия. Со 2-х суток после пересадки отмечалась активация репаративных процессов, в дальнейшем в течение 2–3 сут видимая перестройка грануляций. В результате динамических изменений в дне ТЯ формировалась ГТ розового цвета, мелкозернистая, с высоко адгезивной поверхностью, без патологических налетов. По визуальной оценке состояние новообразованной ГТ соответствовало необходимому для распространения эпителия, в результате чего была отмечена активация процесса эпителизации. При пересадке ДЭ на глубокие трофические дефекты уже на 2-е сутки вся площадь ТЯ, заполненная ДЭ, полностью замещалась новообразованными грануляциями, что также способствовало более быстрому развитию эпителизации.

Образование ГТ, несмотря на всю его значимость, является подготовительным этапом к распространению эпителия. Процесс эпителизации является завершающим в заживлении ТЯ, и именно по нему можно судить о эффективности лечения. Однако следует также отметить, что в 97% случаев больные основной группы отмечали снижение интенсивности болевого синдрома вплоть до его отсутствия, беспокоящего их до трансплантации.

Основным параметром оценки эффективности проводимой терапии является эпителизация трофического дефекта. Скорость эпителизации, как известно, отражает интенсивность распространения эпителия. Результаты скорости эпителизации язвенного дефекта у пациентов основной и контрольной группы отражены в табл. 2.

Полученные результаты говорят о значимом ускорении эпителизации у пациентов основной группы по сравнению с контрольной. Такие

Таблица 2

Скорость эпителизации (%/сут) ТЯ у больных основной и контрольной группы (M±m)

Диагноз		Основная группа	Контрольная группа
Варикозная болезнь	S<12 см ²	12,89±0,86*	6,27±0,58
	S>12 см ²	5,90±0,11*	4,6±0,39
ПТБ		3,85±0,42	3,1±0,36

Здесь и в табл. 3: * Различия с контрольной группой статистически достоверны (p<0,05).

результаты свидетельствуют о том, что пересадка дермального эквивалента на ТЯ оказывает существенное стимулирующее влияние на раневой процесс, выразившееся в ускорении эпителизации трофического дефекта. Учитывая, что дополнительного воздействия лекарственными препаратами, активно влияющими на репаративные процессы в ТЯ, в основной группе не производилось, полученные результаты связаны только с действием ДЭ.

Анализируя результаты исследования, необходимо отметить, что в основной группе не было ни одного случая развития аллергических осложнений. В то время как в контрольной группе отмечены три случая развития аллергических реакций.

Развития признаков острого воспаления, наблюдавшихся в четырех случаях в контрольной группе, в основной группе также отмечено не было. Противовоспалительное действие ДЭ находит свое подтверждение в уменьшении воспалительных компонентов в мазках-отпечатках после пересадки, а также в уменьшении интенсивности болевого синдрома и экссудации непосредственно после пересадки ДЭ.

Окончательным результатом этого этапа лечения было заживление ТЯ у всех пациентов основной и контрольной группы. Однако сроки эпителизации в зависимости от применяемого метода местной терапии существенно отличались (табл. 3).

Таблица 3

Сроки эпителизации (сут) ТЯ у больных основной и контрольной группы (M±m)

Диагноз		Основная группа	Контрольная группа
Варикозная болезнь	S<12 см ²	7,76±0,59*	13,21±0,97
	S>12 см ²	16,95±1,22*	21,74±1,40
ПТБ		25,97±2,14	32,26±2,89

Использование ДЭ способствует достоверно более быстрому заживлению ТЯ, что существенным образом достоверно (p<0,05) сокращает сроки предоперационной подготовки. Этот срок у больных с ВБ в основной группе составил (16,7±2,4) сут, у больных контрольной группы — (22,8±4,1) сут. На рис. 2 представлен пример эффективного лечения ТЯ на фоне ВБ у больной К., 69 лет с использованием ДЭ.

В связи с необходимостью коррекции гемодинамических расстройств, окончательным этапом после заживления трофического дефекта являлось хирургическое лечение, которое было выполнено 77 (74,7%) пациентам. Выбор метода оперативного лечения не зависел от применяемой для заживления ТЯ местной терапии, а основывался на выявленных при комплексном обследовании нарушениях венозного оттока. Больным, страдающим ВБ, выполнялась комбинированная флебэктомия, а также производилась обтурация заднеберцовых вен при наличии в них рефлюкса. Пациентам, страдающим посттромботической болезнью, в 38,7% случаев выполнялись реконструктивные и корригирующие операции, направленные на восстановление нарушенного оттока в системе глубоких вен.

Анализ результатов лечения в сроки от 6 мес до 3 лет выявил, что рецидив ТЯ возник у 12,6% больных. При этом достоверного различия в частоте рецидивирования ТЯ у больных основной и контрольной группы отмечено не было, что свидетельствует о том, возникновение рецидива ТЯ не связано с методом, используемым для местной терапии ТЯ.

Выводы. 1. Результаты биохимических, гистологических и морфометрических исследований, полученные при изучении влияния ДЭ на заживление смоделированной у животных по оригинальной методике длительно незаживающей кожной раны, выявили в ней активацию репаративных процессов вследствие ускорения сроков созревания ГТ и сокращения времени эпителизации раны.

2. Активация и достоверное увеличение скорости репаративных процессов в экспериментально созданной у животных ране происходят под воздействием аллогенных дермальных фибробластов, сохраняющих свою функциональную активность после пересадки ДЭ.

3. Применение дермальных аллогенных фибробластов человека в комплексном лече-

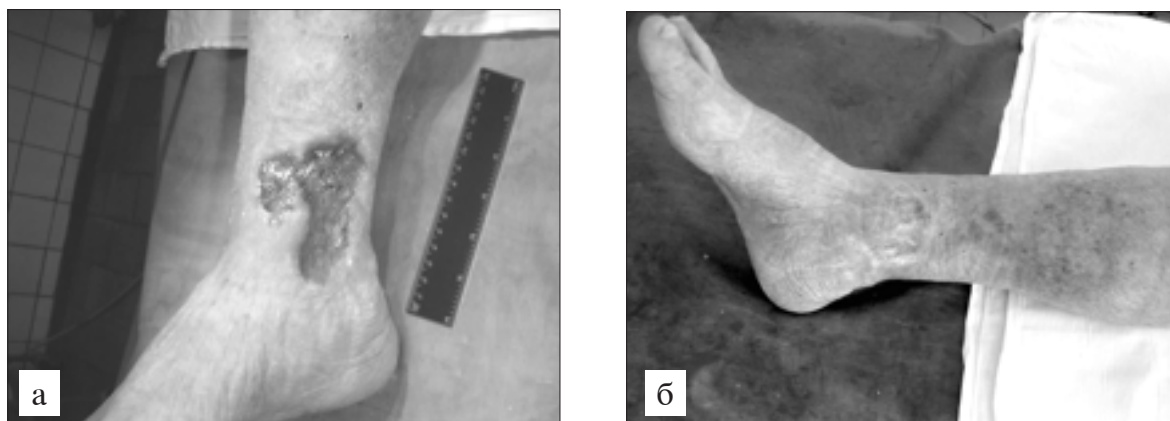


Рис. 2. Заживление ТЯ у больной К., 69 лет.

а — ТЯ до начала лечения; б — полное заживление ТЯ через 17 сут после пересадки ДЭ.

нии больных с ТЯ венозной этиологии достоверно увеличивает скорость их эпителизации. При этом сокращение более чем в 2 раза [до $(7,76 \pm 0,59)$ сут] сроков эпителизации у больных с ВБ с площадью язвенного дефекта до 12 см^2 существенным образом сокращает время к завершающему этапу лечения — хирургической операции, направленной на устранение или снижение флебогипертензии, как основной причины развития заболевания.

4. Использование ДЭ, содержащего дермальные фибробласты человека, является перспективным методом лечения ТЯ венозной этиологии. Этот метод может быть обоснованно включен в комплексную программу лечения ТЯ венозной этиологии и использован у больных с ВБ, осложненной ТЯ площадью до 12 см^2 , как метод выбора при их подготовке к оперативному лечению.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Васютков В.Я., Проценко Н.В. Трофические язвы стопы и голени. — М.: Медицина, 1993. — 160 с.
2. Клемент А.А., Введенский А.Н. Хирургическое лечение заболеваний вен конечностей. — Л.: Медицина, 1976. — 295 с.
3. Колокольцева Т.Д., Юрченко Н.Д., Колосов Н.Г. и др. Перспективы использования фетальных фибробластов человека при лечении ран различной этиологии // Вестн. РАМН. — 1998. — № 3. — С. 32–34.
4. Колокольчикова Е.Г., Будкевич Л.И., Бобровиков А.Э. и др. Патоморфологические изменения ожоговых ран после пересадки аллогенных фибробластов // Бюл. exper. биол. — 2001. — № 1. — С. 107–110.
5. Лапин А.Ю., Топузов Э.Г., Рубцов М.А. и др. Первый опыт использования культивируемых нормальных фибробластов и кератиноцитов человека в комплексном лечении трофических язв нижних конечностей // Клеточные культуры: Информационный бюллетень. — 2004. — № 19. — С. 5–10.
6. Орловский П.И., Гриценко В.В., Мельцова А.Ж., Балакова С.П. Трофические язвы нижних конечностей. — СПб., 2004. — 80 с.
7. Хохлов А.В. Варикозно-трофические язвы // Хирургия. — 2002. — № 10. — С. 53–55.

Поступила в редакцию 18.10.2006 г.

A.Zh.Meltsova, V.V.Gritsenko, P.I.Orlovsky,
V.V.Tomson, V.V.Sabelnikov, E.K.Shulepova,
A.I.Prokopets, G.P.Pinaev, M.I.Blinova, N.M.Yudintseva

APPLICATION OF DERMAL FIBROBLASTS IN COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH TROPIC ULCERS OF VENOUS ETIOLOGY

The authors have analyzed the results of an experimental-clinical investigation devoted to studying the efficiency of local treatment of trophic ulcers at the stage of healing using transplantation of dermal allogenic fibroblasts. The method was proved to accelerate epithelization and to shorten the time of preparing to operations for correction of the venous blood flow.