

УДК 617.58-002.44-08+617.58:616.14

## ПРИМЕНЕНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ВЕНОЗНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ

О. М. РЕШЕТНЯК, доц. А. Е. ОЛЕЙНИК

*Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина*

**Исследована динамика процессов регенерации венозных язв под воздействием обогащенной тромбоцитами плазмы с использованием современных иммуногистохимических методик с применением моноклональных антител на 7-е и 28-е сутки лечения. Результаты показали, что применение обогащенной тромбоцитами плазмы в комплексном лечении венозных язв создает благоприятные условия для протекания репаративных процессов в язве, что влияет на качество созревания и дифференцировки соединительнотканых регенератов и ускоряет краевую эпителизацию.**

*Ключевые слова:* обогащенная тромбоцитами плазма, венозные трофические язвы, иммуногистохимический метод.

Перспективным направлением в комплексном лечении венозных трофических язв является применение обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Идея использования ОТП для стимуляции регенераторных процессов не нова [1]. Первые публикации и исследования применения ОТП принадлежат R. Marx (1998) и E. Anitua (1999). На сегодняшний день накоплен опыт ее эффективного использования в стоматологии, травматологии и ортопедии, комбустиологии, спортивной медицине, косметологии и дерматологии [2]. Ученые располагают данными о выраженной остеондрогенной и ангиогенной активности субстанций, содержащихся в альфа-гранулах тромбоцитов [3]. Есть публикации о применении препаратов ОТП для лечения хронических язв, однако нельзя не

отметить факт значительного эмпиризма при выборе параметров наблюдений [4–7]. Накопленные данные не систематизированы относительно размеров венозных язв, способов терапевтического воздействия и, главное, особенностей морфологического строения. Необходимость четче обозначить морфологию хронических венозных язв, уделив внимание проявлениям терапевтического патоморфоза с применением современных иммуногистохимических методик, обуславливает актуальность нашего исследования.

Цель исследования — изучить влияние ОТП на особенности морфогенеза, динамику процессов регенерации венозных трофических язв при патогенетически направленной коррекции венозной гемодинамики.

Проведен анализ результатов комплексного лечения 78 пациентов с трофическими язвами на фоне варикозной болезни. На первом этапе всем им было выполнено патогенетически направленное хирургическое устранение вертикального и горизонтального вено-венозных рефлюксов с использованием миниинвазивных методик.

В зависимости от варианта местного лечения венозных трофических язв пациенты были распределены на две группы: в основную вошли 42 (53,8%) больных, у которых была использована ОТП, в группу сравнения — 36 (46,2%), которым местно применяли 10%-ную метилурациловую мазь. Обе группы были репрезентативны по гендерным признакам, длительности заболевания и размерам язв. В группе сравнения на момент начала терапии средняя площадь трофических язв у пациентов составляла  $11,6 \pm 2,3$  см<sup>2</sup>, в основной группе —  $12,4 \pm 1,4$  см<sup>2</sup>.

Материалом для гистологического и иммуногистохимического исследований послужили иссеченные фрагменты ткани язв на 7-е и 28-е сутки, которые мы фиксировали 10%-ным забуференным формалином и подвергали парафиновой проводке.

Были использованы современные иммуногистохимические методики с применением моноклональных антител к маркеру пролиферативной активности ki67, коллагенам I, III и IV типов, фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), маркеру эндотелиальных клеток (CD34), фактору роста фибробластов (FGF), эпидермальному фактору роста (EGF), высокомолекулярному цитокератину (Cytokeratin HMW), определялись рецепторы к макрофагам (CD68). Оценивали степень экспрессии антител с помощью полуколичественной шкалы: + — слабая, ++ — умеренная, +++ — выраженная реакция.

На 7-е сутки комплексного лечения с местным применением 10%-ной метилурациловой мази размер язв у пациентов в группе сравнения был  $10,4 \pm 1,4$  см<sup>2</sup>. На перевязке определялось незначительное количество раневого отделяемого, на дне раны визуализировались яркие грануляции. При этом средняя скорость эпителизации раны за сутки составила  $31,0 \pm 0,4$ %. К 15-м суткам лечения площадь составляла  $9,0 \pm 1,4$  см<sup>2</sup>. У 2 (2,8%) больных сохранялись умеренное количество раневого отделяемого и гиперемия краев раны. Выраженная краевая эпителизация трофической язвы наблюдалась у 68 (97,2%) пациентов, скорость заживления составляла  $1,9 \pm 0,3$ %, площадь ран к 21-м суткам —  $7,7 \pm 0,9$  см<sup>2</sup>. Отмечалась интенсивная эпителизация краев раны, при этом в сутки она уменьшалась на  $2,1 \pm 0,3$ %. Полная эпителизация венозных трофических язв у больных в группе сравнения наступила в сроки  $46 \pm 7,4$  сут, причем средняя скорость краевой эпителизации за весь период составила  $2,3 \pm 0,4$ %.

В основной группе на 7-е сутки лечения средняя площадь раневых дефектов составляла  $11,1 \pm 2,1$  см<sup>2</sup>. У 4 (5,1%) больных оставались

явления воспаления в ране, незначительное количество раневого отделяемого, на дне визуализировались яркие сочные грануляции. За сутки раны уменьшались на  $1,5 \pm 0,3$ %. На 15-е сутки лечения средняя площадь ран была  $9,3 \pm 1,8$  см<sup>2</sup>, к этому времени воспалительные и некротические процессы во всех язвах исчезли. Скорость заживления за сутки составляла  $2,3 \pm 0,2$ %. К 21-м суткам лечения средняя площадь ран составляла  $7,1 \pm 0,6$  см<sup>2</sup>. На момент исследования у больных с язвами больших размеров наблюдались организованные сформированные грануляции с интенсивной краевой эпителизацией раны. Полная эпителизация трофических язв у пациентов в группе сравнения отмечалась в сроки  $31 \pm 4,6$  сут ( $p < 0,05$ ), при этом средняя скорость краевой эпителизации за весь период составила  $4,3 \pm 0,4$ % ( $p < 0,05$ ).

В группе сравнения на 7-е сутки лечения были выявлены следующие гистологические и иммуногистохимические особенности. В целом грануляционная ткань демонстрировала незначительную, реже умеренную степень отека, с беспорядочно ветвящимися сосудами, что придавало ей гроздьевидный или ячеистый вид, однако на отдельных участках можно было наблюдать тенденцию к вертикальной ориентации кровеносных сосудов. Обнаружена воспалительная инфильтрация умеренной плотности, представленная немногочисленными лимфоцитами, плазмócитами, полиморфноядерные лейкоциты были единичны или не обнаруживались. Определено умеренное количество макрофагов. Эндоваскулиты, очагово выявляемые в грануляционной ткани, имели подострый характер, эндотелий сосудов проявлял умеренную пролиферативную активность. Коллаген IV типа выявлялся в виде четких петель, формирующих ажурные сетчатые структуры. Кроме того, в местах гроздьевидного строения грануляционной ткани найдены единичные локусы спонтанных депозитов коллагена IV типа. Коллагены I и III типов имели вид спонтанно ориентированных, нечетко очерченных структур с преобладанием I типа. Среди представителей фибробластического домена преобладали малодифференцированные фибробласты, однако популяция дифференцированных коллагенобластов также была довольно значительной. Кроме того, в тканях язвы можно было наблюдать участки реэпителизации в виде очагов пролиферирующего многослойного плоского эпителия, местами формирующих островки в толще созревающей грануляционной ткани, а местами имеющих вид поверхностных пластов эпителиоцитов, как бы предпринимающих попытку создать покров для ниже лежащей грануляционной ткани. На границе новообразованного эпителиального пласта и ниже лежащей ткани иммуногистохимическими методами установлена примитивная прерывистая базальная мембрана, представленная коллагеном IV типа.

В эти же сроки в основной группе больных, где местное лечение венозных трофических язв

проводили с помощью ОТП, отмечалось практически полное исчезновение отека грануляционной ткани, по сравнению с микропрепаратами группы контроля участки гроздьвидного строения выявлялись в единичных срезах, сосуды грануляционной ткани приобрели преимущественно вертикальную ориентацию. Установлено значительное снижение пролиферативной активности эндотелия сосудов грануляционной ткани, о чем свидетельствует низкая степень экспрессии CD34. Воспалительная инфильтрация носила очаговый характер, инфильтрат обнаруживался в участках, где имело место сохранение гроздьвидного типа строения грануляционной ткани. Клеточный состав инфильтрата был представлен Т- и В-лимфоцитами.

Не было выявлено значительных изменений в соотношении различных представителей фибробластического домена по сравнению с препаратами группы сравнения. Основными клеточными типами оставались недифференцированные коллагенобласты с достаточно явным присутствием дифференцированных коллагенобластов, наличием коллагенокластов. Степень экспрессии различных типов коллагена также значительно не отличалась от группы сравнения: были выявлены нежные петлистые сети коллагена IV типа и разбросанные депозиты I и III типов. Следует отметить, что экспрессия коллагена III типа у больных основной группы была более выражена по сравнению с пациентами группы сравнения, что позволило судить о смещении пропорций содержания фибриллярных типов коллагена в пользу увеличения его III типа.

У больных основной группы обращало на себя внимание значительное увеличение зон реэпителизации в отличие от пациентов группы сравнения. При этом многослойный плоский эпителий, проявляя достаточно высокую пролиферативную активность, демонстрировал достаточно четкую послойную дифференцировку эпителиоцитов. Более «зрелый» вид имела базальная мембрана эпителия, образованная коллагеном IV типа. Экспрессия его умеренной степени выраженности (++) выявлялась на всем протяжении эпителиального пласта, изредка чередуясь с участками со слабой (+) степенью.

На 28-й день исследования в биоптатах группы сравнения произошли следующие изменения. Так, интерес вызывал вид очагов реэпителизации язвы: эпителиальный пласт имел значительную толщину, что макроскопически объясняло выраженную индурацию и гиперпигментацию кожи. Микроскопически же в тканях обнаружен выраженный акантоз эпителиального пласта и высокая пролиферативная активность эпителиоцитов, особенно базального слоя. В базальной мембране эпителия, образованной коллагеном IV типа, были сформированы плотные нефибриллярные структуры, повторяющие контур эпителиального пласта, с наличием своеобразного ветвящегося рисунка, что при очень высокой степени его экспрессии

(+++++) (суперэкспрессии) создавало впечатление избыточного накопления коллагена IV типа. Субэпидермально обнаружены очаговые лимфоидные микроинфильтраты. Ниже дерма имела вид грубоволокнистой соединительной ткани с хаотичной ориентацией волокон, что подтверждено иммуногистохимическими реакциями с рецепторами к различным типам коллагена. В отличие от эпителиальной базальной мембраны в виде единичных очаговых мелких депозитов выявлен коллаген IV типа. Коллагены I и III типов имели вид достаточно объемных структур глыбчатого строения, лишенных правильной пространственной ориентации. Сохранялась диспропорция содержания коллагенов I и III типов со значительным перевесом I типа. В отдельных биоптатах установлено сочетание участков грубоволокнистого строения с участками умеренно выраженного отека дермы. Данное явление имело место в очагах активного неопластического процесса, что подтверждено результатами иммуногистохимии. Новообразованные сосуды имели рыхлый эндотелий с достаточно большими эндотелиальными щелями и признаками пролиферативной активности эндотелиоцитов. Среди представителей фибробластического звена доминировали зрелые коллагенобласты, активно продуцирующие коллаген, при этом малодифференцированные фибробласты были достаточно многочисленны. Обнаружены коллагенокласты как в виде отдельных представителей этого типа клеток, так и небольших групп. В участках скопления коллагенокластов в толще грубоволокнистой соединительной ткани найдены макрофаги в небольшом, реже умеренном количестве. Эти клетки имели признаки фагоцитарной активности, что, очевидно, связано с попытками ремоделирования соединительной ткани — резорбции дефектных коллагеновых структур и нехарактерных типов коллагена.

В биоптатах из язв пациентов основной группы, взятых на 28-е сутки, были следующие изменения. Среди клеток фибробластического домена преобладали активные коллагенобласты, при этом малодифференцированные фибробласты практически не обнаружены. Вблизи этих коллагенобластов в межклеточном матриксе отмечалось интенсивное образование зрелых коллагеновых фибрилл нативного типа с последующим формированием пучков фибрилл — волокон. В группе больных, лечение которых проводили с помощью ОТП, установлено наличие миофибробластов. Последние, помимо контракции новообразованной ткани, детерминируют пространственную ориентацию формирующихся пучков коллагеновых волокон. Последние состоят из коллагенов I и III типов, представлены четко ориентированными пучками, лежащими параллельно эпидермальному слою. Количество среди фибриллярных типов коллагена по-прежнему преобладал коллаген I типа, однако содержание коллагена III типа в данной группе было наиболее значительным. В эпидермисе,

покрывающем язвенный дефект, в большинстве биоптатов четко прослеживается дифференцировка на базальный, шиповатый и зернистый слой, при этом признаков кератинизации блестящего и рогового слоев не выявлено.

Обращают на себя внимание высокая пролиферативная активность базального слоя, что характерно для очагов реэпителизации, а также увеличенное по сравнению с нормальной кожей количество меланоцитов. Плотность дермы в биоптатах больных основной группы достаточно равномерна, у них не обнаружено чередования очагов грубого склероза с участками отека. Сосуды дермы имеют просветы округлой формы, правильно сформированную стенку, компактный уплощенный эндотелий. Воспалительной инфильтрации, в том числе и периваскулярной, не отмечено, однако обнаружены в небольшом количестве макрофаги с признаками фагоцитарной активности.

Несмотря на хирургическую коррекцию макрокродинамики у больных с тяжелыми формами варикозной болезни сохраняются регионарные нарушения микроциркуляции, что отражается на динамике течения репаративных процессов. Основным показателем активности процесса заживления является интенсивность формирования капиллярного русла в местах повреждения. Так, заживление протекает быстрее в лучшем васкуляризованных тканях. В данном исследовании, несмотря на устранение патологических вено-венозных рефлюксов, у пациентов группы сравнения отмечается патология новообразованных сосудов (увеличение их проницаемости, извилистости), т. е. несовершенный ангиогенез. В результате происходит заполнение тканевого дефекта грануляционной тканью с неадекватной неоваскуляризацией, что пролонгирует процесс заживления раны. Кроме того, морфологическая картина свидетельствует о негармоничном развитии репаративной регенерации с нарушением структур внеклеточного матрикса, который играет важную формообразующую роль в заживлении язв. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало дисрегуляцию синтеза коллагена у больных в группе сравнения, что согласуется с данными литературы о нарушении соотношения коллагена I и III типов при длительно не заживающих ранах [8]. В свою очередь, в рамках работы было отмечено восстановление количественных соотношений таких структурных элементов соединительной ткани, как коллаген I и III типов у пациентов основной группы на

фоне комплексного лечения с местным применением ОТП. В то же время у обследуемых группы сравнения сохранялся дисбаланс в типовом составе внеклеточного матрикса. Кроме того, у них отмечалось увеличение незрелых форм фибриллярных структур, что может отразиться на качественных характеристиках соединительной ткани и способствовать рецидиву язв.

Наблюдения многих авторов свидетельствуют о тесной взаимосвязи между процессами эпителизации и роста соединительной ткани [8, 9]. Нельзя исключить, что незрелость грануляционной ткани и дефицит одного из основных компонентов базальной мембраны — коллагена IV типа являются одними из причин замедления реэпителизации у пациентов группы сравнения. В свою очередь, в препаратах, полученных в основной группе, можно отметить формирование полноценной базальной мембраны и полную реэпителизацию.

Благодаря оценке клинического течения раневого процесса в тесной связи с морфологическими и гистохимическими данными была подтверждена целесообразность использования ОТП наряду с хирургическим вмешательством. Представленный подход к лечению венозных трофических язв позволяет воздействовать на основные звенья патологического процесса. Комплексное, патогенетически направленное лечение пациентов с тяжелыми формами варикозной болезни с совместным применением хирургического лечения и средств, направленных на стимуляцию регенерации, позволяет сократить сроки заживления и обеспечивает стойкий долгосрочный положительный результат.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно сделать следующие выводы.

Патогенетически оправдано применение хирургического лечения с устранением вено-венозных рефлюксов в сочетании с методами регенерационной медицины у пациентов с тяжелыми формами варикозной болезни.

Комплексное лечение с местным применением ОТП сокращает сроки заживления венозных трофических язв.

Использование ОТП для местного лечения венозных трофических язв позволяет активизировать синтез соединительной ткани без изменения ее структуры, что проявляется нормализацией соотношения фибриллярных типов коллагена, отсутствием очагов его атипичной локализации, адекватным ангиогенезом.

#### Список литературы

1. McAleer, J. P. Efficacy of concentrated autologous platelet-derived growth factors in chronic lower extremity wounds / J. P. McAleer, E. Kaplan, G. Persich // J. Am. Podiatr. Med. Assoc.— 2006.— Vol. 96.— P. 482–488.
2. Зинин В. Ю. Использование богатой тромбоцитами плазмы (БТП) в лечении больных с венозными трофическими язвами / В. Ю. Зинин, А. М. Кожевников, В. А. Зотов // Материалы III хирургического конгресса «Научные исследования в реализации программы “Здоровье населения России”, Москва, 21–24 февраля 2008 г. / Новосибирский государственный медицинский университет.— М., 2008.— С. 265–266.
3. Обогащенная тромбоцитами плазма в лечении трофических язв / И. В. Крайник, А. С. Ремизов,

- И. Н. Сонькин [и др.] // Вестн. неотложной и восстановительной медицины.— Донецк, 2014.— Т. 15, № 1.— С. 83.
4. Campos R. C. Platelet-rich plasma in skin ulcer treatment / R. C. Campos, N. P. Diez, F. A. Barandiaran // Wounds.— 2013.— Vol. 25, Iss. 9.— P. 256–262.
  5. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds / G. Crovetti, G. Martinelli, M. Issi [et al.] // Transus. Apher. Sci.— 2004.— Vol. 30.— P. 145–151.
  6. Gürgen M. Treatment of chronic wounds with autologous platelet-rich plasma / M. Gürgen // EWMAJ.— 2008.— Vol. 8, № 2.— P. 5–10.
  7. Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds / P. Stenvorde., L. P. van Doorn, C. Naves [et al.] // J. Wound Care.— 2008.— Vol. 17.— P. 60–63.
  8. Дерматопластика раневых дефектов / В. И. Хрупкин, В. Ф. Зубрицкий, А. Н. Ивашкин [и др].— М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.— 195 с.
  9. Farahat A. Evaluation of the clinical and histopathological effect of Platelet rich plasma on chronic wound healing / A. Farahat, E. H. Salah, M. Al-Shraim // J. of Basic and Clin. Studies.— 2014.— Vol. 2, № 6.— P. 55–61.

### ЗАСТОСУВАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ У КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ВЕНОЗНИХ ТРОФІЧНИХ ВИРАЗОК

О. М. РЕШЕТНЯК, А. Є. ОЛІЙНИК

Досліджено динаміку процесів регенерації венозних трофічних виразок під впливом збагаченої тромбоцитами плазми з використанням сучасних імуногістохімічних методик із застосуванням моноклональних антитіл на 7-му і 28-му добу лікування. Результати показали, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми у комплексному лікуванні венозних виразок створює сприятливі умови для перебігу репаративних процесів у виразці, що впливає на якість дозрівання і диференціювання сполучнотканинних регенератів та прискорює крайову епітелізацію.

*Ключові слова:* збагачена тромбоцитами плазма, венозні трофічні виразки, імуногістохімічний метод.

### THE USE OF PLATELET RICH PLASMA FOR COMBINED TREATMENT OF VENOUS TROPHIC ULCERS

O. M. RESHETNIAK, A. Ye. OLIINYK

The dynamics of the processes of regeneration of venous ulcers under the influence of platelet rich plasma was investigated using modern immunohistochemical techniques with monoclonal antibodies on days 7 and 28 of treatment. Our findings suggest that the use of platelet rich plasma in the complex treatment of venous ulcers creates more favorable conditions for reparative processes in the ulcer that influences the quality of maturation and differentiation of connective tissue regenerates and accelerates edge epithelialization.

*Key words:* platelet rich plasma, venous trophic ulcers, immunohistochemical technique.

Поступила 31.05.2016