

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКВИВАЛЕНТА ДЕРМЫ В ЛЕЧЕНИИ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

К. м. н. А.Г. ПОПАНДОПУЛО, профессор А.А. ШТУТИН, Г.В. КАЗАКОВ

*Институт неотложной и восстановительной хирургии
им. В.К. Гусака АМН Украины, Донецк*

Представлены результаты применения дермального эквивалента, полученного методами тканевой инженерии, в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии. Показаны патогенетическая обоснованность предлагаемого метода и возможные его преимущества перед аутодермопластикой.

Трофические язвы различной этиологии стали серьезной медико-социальной проблемой в связи с большой распространенностью данной патологии. Среди этиологических факторов развития трофических язв ведущее место занимает хроническая венозная недостаточность, которой, по данным разных авторов, страдает 10–20 % взрослого населения индустриально развитых стран [2–3]. Несмотря на очевидный прогресс в диагностике и лечении заболеваний вен нижних конечностей, распространенность трофических язв венозного генеза остается постоянной (1–2 % взрослого населения) на протяжении последних 20 лет [2].

На сегодняшний день является общепризнанным, что эффективное лечение данного контингента пациентов возможно только при использовании комплексного подхода, предусматривающего как хирургическую коррекцию основной патогенетической причины — флебогипертензии, так и адекватное лечение самого язвенного дефекта. Полученные в последние годы данные о биологических процессах, протекающих в хронических ранах на клеточно-молекулярном уровне, позволили расширить представления о патогенезе трофических язв и предложить новые подходы к их лечению [4–6].

Цель данного исследования заключалась в разработке методики применения дермального эквивалента (ДЭ) собственного производства в лечении трофических язв нижних конечностей венозной этиологии.

В исследование были включены 5 пациентов в возрасте от 36 до 54 лет, страдающих варикозной болезнью в стадии декомпенсации. У них имелись одиночные трофические язвы площадью от 12,7 до 46,5 см² (в среднем — 30,5 см²). Длительность существования язвенного дефекта составляла от 1,5 до 5 лет. Все больные были обследованы традиционными клиническими, лабораторными и инструментальными методами. На предыдущем этапе лечения всем пациентам было произведено оперативное вмешательство — комбинированная флебэктомия с лигированием несостоятельных перфорантов. Эффективность хирургической процедуры была подтверждена доплеровским исследованием венозного кровотока ультразвуковым сканером Sonoline Elegra advanced фирмы «Siemens». В дальнейшем на протяжении 4 нед проводилось консервативное лечение трофических язв общепринятыми методами, которое не привело к положительным изменениям в динамике раневого процесса. Двум больным была выпол-

нена аутодермопластика расщепленным кожным лоскутом по общепринятой методике, также не имевшая успеха. Неэффективность хирургического и/или консервативного лечения послужила показанием к аппликации дермального эквивалента.

Работы по культивированию клеток и созданию тканевого эквивалента дермы проводились в Лаборатории клеточного и тканевого культивирования ИВХ АМН Украины (Донецк).

Дермальный эквивалент представляет собой трехмерную структуру, состоящую из фетальных фибробластов человека, заключенных в коллагеновый гель. Фетальные фибробласты выделяли из абортивного материала, полученного в ходе плановых операций по прерыванию беременности при сроках гестации до 8 нед.

Первичный биоматериал, предназначенный для дальнейшего культивирования, проходил обязательное микробиологическое и вирусологическое тестирование: анализ сыворотки крови на наличие HbS-антигена, антител к ВИЧ-инфекции, возбудителю сифилиса, вирусу гепатита С и гепатита В в соответствии с действующим законодательством для обследования донорского материала. Дополнительно проводилось тестирование на контаминацию материала микоплазмой, хламидиями, вирусами Эпштейна—Бара, герпеса и цитомегаловирусом. Клеточный материал использовался в экспериментальных работах с обязательного согласия доноров.

Выделение, культивирование и пассирование фетальных фибробластов проводилось по общепринятым методикам [1]. Для создания ДЭ использовались клетки 4–6 пассажей. Коллагеновый гель готовили по стандартной методике из раствора коллагена I типа, получаемого экстракцией уксусной кислотой [1].

ДЭ готовили в пластиковых чашках Петри путем смешивания раствора коллагена и суспензии фетальных фибробластов по методу E. Bell et al. [7] с оригинальными модификациями. Готовый ДЭ замораживали в парах жидкого азота и хранили в низкотемпературном морозильнике при -70°C до использования. За день до трансплантации ДЭ отогревали на водяной бане, заливали культуральной средой и культивировали в течение 12–24 ч в стандартных условиях.

Аппликации ДЭ проводили на заранее подготовленное раневое ложе. Обязательными условиями при этом были отсутствие бактериальной инфекции, полное удаление некротических и иссечение рубцово-из-

мененных тканей в области дна и краев язвы. ДЭ переносили из чашки Петри на раневое ложе и размещали таким образом, чтобы он не только заполнял раневой дефект, но и приблизительно на 1 см покрывал окружающие ткани. Затем ДЭ покрывали гипoadгезирующим раневым покрытием Paraneet, салфетками с антибиотиками и накладывали многослойный компрессионный бандаж. Первую перевязку проводили на 4–7-е сутки, а затем — один раз в неделю до полного закрытия раневого дефекта. При каждой перевязке производили измерение площади раны. Низкая скорость эпителизации служила критерием для реапликации ДЭ. Всем пациентам рекомендовали в течение первых 5 дней после аппликации не опираться на поврежденную конечность и избегать активных движений.

Высокая резистентность трофических язв венозной этиологии к традиционным методам лечения обусловила интенсивные исследования процессов, происходящих на клеточно-молекулярном уровне в хронических ранах и препятствующих их заживлению. Было установлено, что в области хронических ран развиваются патологические изменения в экспрессии целого ряда регуляторных молекул (цитокинов и факторов роста), возникает дисбаланс между продукцией матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, угнетается продукция молекул внеклеточного матрикса [4; 8]. Нарушается также функциональная и пролиферативная активность макрофагов и фибробластов. В популяции фибробластов из области хронических раневых дефектов значительно увеличивается процентное содержание клеток со сниженным пролиферативным потенциалом, нарушается регуляция синтеза коллагена и его продукция. Изменяется ответ клеток на регуляторные сигналы, стимулирующие в норме их пролиферативную и синтетическую активность, а степень и выраженность этих патологических изменений зависит от длительности существования хронической раны [9; 10].

В то же время коллектив авторов из Голландии в своей работе показал, что при хронических венозных язвах эпидермальные клетки сохраняют свой пролиферативный потенциал и способность отвечать на митогенные стимулы неизменными [11].

Совокупность подобных патологических изменений, происходящих на клеточно-молекулярном уровне и затрагивающих в первую очередь клетки соединительной ткани, может лежать в основе резистентности некоторых язв к общепринятым методам лечения.

На основании этих данных были предложены различные подходы для стимуляции репаративных процессов в хронических ранах с использованием широкого спектра таких биологических агентов, как факторы роста, ингибиторы протеаз, культуры клеток и эквиваленты тканей. Наиболее перспективным оказалось использование живых фетальных или неонатальных клеток, что, вероятно, связано с их способностью нормализовать тканевое микроокружение путем синтеза и секреции многочисленных цитокинов, факторов роста и молекул внеклеточного матрикса. Наибольшее распространение получили два продукта: Dermagraft (производитель «Advanced Tissue Sciences», США) — дермальный эквивалент, состоящий из неонатальных

фибробластов в трехмерном матриксе из биodeградируемого полимера полигликолевой кислоты [5]; и Graftskin/Apligraf (производители «Organogenesis» и «Novartis Pharmaceuticals», США) — «живой эквивалент кожи», созданный на основе коллагенового геля из телячьего коллагена I типа и неонатальных фибробластов и кератиноцитов человека [6]. Оба продукта в настоящее время активно используются в Западной Европе и США при лечении диабетических и венозных язв [4]. Однако они не получили распространения в Украине из-за высокой стоимости.

Используемые для создания подобных структур фетальные либо неонатальные клетки отличаются от клеток взрослого организма повышенной метаболической активностью, большей устойчивостью к гипоксии, синтезом широкого спектра биоактивных веществ и способностью более эффективно индуцировать неонтогенез [1]. Благодаря этим свойствам тканевые эквиваленты либо клеточные культуры способны нормализовать тканевое микроокружение в области хронического раневого дефекта и стимулировать его заживление [4].

В нашем исследовании использование оригинального ДЭ позволило добиться полного закрытия трофических язв у всех пациентов в сроки от 24 до 32 дней (в среднем 26,5 дня). При этом трем пациентам потребовалась единичная аппликация ДЭ, а двум была проведена реапликация через 2 нед ввиду недостаточно выраженной скорости эпителизации. Следует отметить, что у этих двух больных трофические язвы существовали длительное время — 4,5 и 5 лет.

У всех больных уже на первой перевязке наблюдалось интенсивное формирование грануляционной ткани и отмечались признаки краевой эпителизации. На второй перевязке имело место полное заполнение раневого дефекта зрелой грануляционной тканью у всех пациентов. У трех из них также отмечалось выраженное сокращение площади язвы со скоростью 3,5–3,9% в сутки. У двух пациентов, у которых эпителизация раневого дефекта происходила с меньшей скоростью, после повторной аппликации ДЭ скорость значительно возросла и сохранялась на уровне 2,9–3,3% в сутки до полного закрытия трофической язвы.

На протяжении всего курса лечения ни у одного из пациентов не было отмечено каких-либо осложнений, связанных с использованием ДЭ (таких, как инфицирование ДЭ, развитие аллергических реакций либо выраженное отторжение ДЭ), что соответствует литературным данным [4–6].

Таким образом, по результатам нашего исследования, аппликация ДЭ оказалась весьма эффективной процедурой у больных с длительно существующими трофическими язвами венозной этиологии, резистентными к традиционным методам консервативного лечения, в том числе не закрывшихся после аутодермопластики расщепленным кожным лоскутом.

Применение оригинального дермального эквивалента представляет собой новое перспективное направление в лечении хронических трофических язв венозной этиологии, которое может быть с успехом использовано для стимуляции заживления длительно существующих раневых дефектов, резистентных к традиционным

методам лечения. Необходимы, однако, дальнейшие исследования на большем клиническом материале с целью определения клинической и экономической эффективности данного подхода при различных схемах лечения.

Литература

1. *Гаврилюк Б.К., Рочев Ю.А., Николаева Т.Н.* Культура клеток и реконструкция ткани (на примере кожи).— Пущино: НЦБИ АН СССР, 1988.— 123 с.
2. *Литвицкий Е.М.* Лечение трофических язв нижних конечностей.— М.: Медицина, 2001.— 160 с.
3. *Яблоков Е.Г., Кириенко А.И., Богачев В.Ю.* Хроническая венозная недостаточность.— М.: Медицина, 1999.— 346 с.
4. *Harding K.G., Morris H.L., Patel G.K.* Healing chronic wounds // *BMJ.*—2002; 324 (1): 160–163.
5. *Pollak R.A., Edington H., Jensen J.L.* A human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers // *Wounds.*— 1997; 9: 175–183.
6. *Trent J.F., Kirsner R.S.* Tissue engineered skin: Apligraf, a bilayered living skin equivalent // *Int. J. Clin. Pract.*— 1998; 52 (6): 408–413.
7. *Bell E., Ehrlich H.P., Sher S.* Development and use of a living skin equivalent // *J. Plastic & Reconstruct. Surg.*—1981; 3: 386–392.
8. *Trengove N.J., Stacey M.C., MacAuley S.* Analysis of the acute and chronic wound environments: The role of proteases and their inhibitors // *Wound Rep. Regen.*— 1999; 7: 442–452.
9. *Agren M.S., Steenfors H.H., Dabelsteen S.* Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent // *J. Invest. Dermatol.*— 1999; 112 (3): 463–469.
10. *Hasan A., Murata H., Falabella A.* Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor- α // *J. Dermatol. Sci.*— 1997; 16 (1): 59–66.
11. *Andriessen M., van Bergen B., van de Kerkhof F.* Epidermal proliferation is not impaired in chronic venous ulcers // *J. Am. Acad. Dermatol.*— 1998; 39 (8): 737–740.

Поступила 05.06.2003

FIRST EXPERIENCE OF DERMA EQUIVALENT APPLICATION IN TREATMENT TROPHIC ULCERS OF LOWER EXTREMITIES

A.G. Popandopulo, A.A. Shtutin, G.V. Kazakov

Summary

The authors present the results of the use of dermal equivalent produced by tissue engineering in complex treatment of trophic ulcers of venous origin. Pathogenetic reasonability of the suggested technique and its possible advantages over autodermoplasty is shown.