С. А. Морозов, Г. Н. Герасимов, О. В. Гречанов

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

ДЗ «ДКЛ ст. Харків» СТГО ПЗ»

© С. А. Морозов, Г. Н. Герасимов, О. В. Гречанов

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ ДАЛАРГИНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВЯЛОГРАНУЛИРУЮЩИХ РАН И ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Резюме. В работе проведено изучение иммуногистохимических характеристик раневого процесса в ВГР и ТЯ НК при системном введении даларгина. Также проведена оценка клинической эффективности традиционного способа лечения и с использованием даларгина у больных с ВГР и ТЯ НК. Полученные результаты позволяют считать, что применение даларгина в комплексном лечении ВГР и ТЯ НК стимулирует пролиферацию капилляров грануляционной ткани, миграцию фибробластов, усиливает их морфофункциональную активность, обеспечивает ускорение новообразования грануляционной ткани.

Сравнительная оценка клинической эффективности разработанного способа лечения с традиционным свидетельствует о следующих преимуществах разработанной методики: 1) сокращаются сроки очищения ран от некрозов; 2) сокращаются сроки появления активных грануляций; 3) сокращаются сроки начала краевой эпителизации. Наличие у разработанного способа вышеуказанных преимуществ позволяет сократить средние сроки стационарного лечения (среднего койко-дня) у данной категории пациентов.

Ключевые слова: *иммуногистохимическое исследование, даларгин, вялогранулирующие раны, трофические язвы.*

Введение

Вялогранулирующие раны (ВГР) и трофические язвы нижних конечностей (ТЯ НК) являются распространенными и трудноизлечимыми заболеваниями, приводящими к длительной утрате трудоспособности и инвалидности у 10-67 % больных, что во многом обусловлено ростом заболеваемости сахарным диабетом, хронической венозной недостаточностью и атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей, являющихся причиной гнойно-некротических поражений нижних конечностей, особенно у лиц, старше 45 лет [1, 4, 5].

Средства для лечения ран должны оказывать положительное влияние на микроциркуляцию, активизировать рост капилляров грануляционной ткани и процессы эпителизации раны, нормализовать течение воспалительной реакции. Этим требованиям в значительной мере отвечает препарат даларгин (Dalarginum).

По данным литературы [6] даларгин обладает тремя механизмами действия на клеточном уровне: 1 – увеличение сосудистой проницаемости; 2 – активация лимфотока; 3 – активация диапедеза лейкоцитов, способствующей активизации их фагоцитарной функции во внесосудистом пространстве. Совокупность эффектов даларгина позволяет использовать его в комплексном лечении ВГР и ТЯ НК любой этиологии.

Цель исследования

1. Изучить иммуногистохимические характеристики раневого процесса в ВГР и ТЯ НК при системном введении даларгина.

2. Провести оценку клинической эффективности традиционного способа лечения и с использованием даларгина у больных с ВГР и ТЯ НК.

Материалы и методы исследования

В клинике общей хирургии на базе ДЗ «ДКЛ ст. Харків» СТГО «ПЗ» за 2005-2010 годы было пролечено 223 больных с ВГР и ТЯ НК различной этиологии. Из них было отобрано 43 больных, включенных в исследование и распределенных в две группы по схемам лечения. Включение больных в каждую из указанных групп носило случайный характер и зависело от дней их поступления в стационар. Все группы пациентов были репрезентативны по возрастному и половому составу, давности основного заболевания, начала развития и размеров ВГР и ТЯ.

Группа А (контрольная) – 20 больных, получавших традиционные схемы лечения ВГР и

ТЯ в соответствии с этиологией страдания (6 больных с варикозной болезнью (ВБ) и посттромбофлебитической болезнью (ПТФБ); 8 – с сахарным диабетом (СД); 6 – с хронической ишемией нижних конечностей на фоне атеросклероза (ХИНК)).

Группа В (основная) – 23 больных, которым на фоне традиционных схем лечения было проведено системное лечение даларгином (10 – ВБ и ПТФБ, 8 – СД, 5 – ХИНК).

Всем пациентам проводилось комплексное исследование с использованием общеклинических методов диагностики, лабораторных методик (клинических, биохимических, бактериологических, цитологических, иммуногистохимических с использованием МКА к CD_{34}).

Нами была предпринята попытка на фоне традиционных схем лечения ВГР и ТЯ НК применить стимуляцию микроциркуляторных и регенераторных процессов системно – введением даларгина. Даларгин вводили медленно внутривенно в дозе 1 мг в 10 мл изотонического раствора натрия хлорида со второго дня пребывания в стационаре в течение 7–10–14 дней (в зависимости от наблюдаемого эффекта).

Гистологическому исследованию подвергались биоптаты края ВГР и ТЯ НК. Из способов гистологической идентификации мы применяли окраску гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону [2].

Кроме того, для уточнения механизма действия на репаративные процессы анализируемых способов лечения, использовали разработанную нами методику иммуногистохимического определения CD_{34+} в биоптате раны с помощью моноклональных антител к CD_{34} (МКА к CD_{34}) (Патент України № 39445, опубл. 25.02.2009 г. Г. Н. Герасимов, Г. И. Губина) [3].

В биоптате изучали: относительные объемы грануляционной ткани и некротических масс, подсчитывали количество сосудов грануляционной ткани в поле зрения микроскопа при увеличении х400, с характеристикой формы, размеров и степени гетерохромности эндотелиоцитов. Качество кровоснабжения грануляционной ткани оценивали по уровню морфофункциональной активности фибробластов, путем определения средней площади ядер фибробластов.

Результаты исследования и их обсуждение

До лечения у больных с ХВН при визуальной оценке раневого процесса ткани вокруг ТЯ были отечными, инфильтрированными, умеренно гиперемированными, с подрытыми краями, дно – с гнойно-некротическим отделяемым, без эпителизации. ВГР и ТЯ у больных сахарным диабетом и атеросклерозом артерий НК были покрыты фиброзным налетом, у 1/3 больных отмечались вялые, тусклые грануляции в виде отдельных островков, эпителизация не наблюдалась ни у одного больного до начала лечения.

На третьи сутки лечения в обеих группах больных сохранялась реакция воспаления вокруг ТЯ на фоне ХВН, преобладал серозно-гнойный характер отделяемого. К 5-7 суткам поверхность ТЯ очищалась к этому сроку от гнойно-некротических наложений у всех больных.

В контрольной группе сроки лечения составляли в среднем 53,05±4,56 койко-дня, что существенно выше, чем в остальных групп.

В группе Б (даларгин) до 14-го дня лечения ТЯ зажили у одного больного с ХВН, до 21 дня – еще у двух больных: 1 – с ХВН и 1 – с СД. Средний срок пребывания в стационаре в группе В составил 29,91 дня±1,95 дня.

К моменту выписки из стационара маллеолярный объем уменьшился у всех больных с ХВН и составил в группе А 22,5±0,671 см ($p \leq 0,05$), в группе В – 22,9±0,504 см ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о более быстрой и интенсивной динамике устранения отека в пораженной конечности в группе с даларгином.

Обращает на себя внимание, что раневой процесс в группе А (традиционное лечение) характеризовался затяжным периодом очищения раны и, несмотря на развитие грануляционной ткани, медленной эпителизацией. Очищение ВГР и ТЯНК в группе Б происходило к 7-8 суткам. Такая же тенденция зарегистрирована и по другим показателям течения раневого процесса.

Цитологическое изучение раневого процесса показало, что в обеих группах до начала лечения преобладал дегенеративно-воспалительный тип цитограмм: большое количество свободно лежащей и внутриклеточной микрофлоры (кокковой и палочковой), преобладание нейтрофилов с признаками дегенерации, дистрофии и распада, незавершенный фагоцитоз бактерий.

При традиционном способе лечения ВГР и ТЯ, (группа А), как свидетельствуют результаты цитологического исследования, фаза воспаления характеризуется выраженной нейтрофильной реакцией и увеличением общего количества нейтрофилов главным образом за счет дегенеративных форм (табл. 1).

Цитологическая картина раневого процесса в группе А свидетельствовала о вялых регенеративных процессах в течение первых 2 недель традиционного лечения: до 10–14-го дня лечения отмечалось выраженное увеличение общего числа одноядерных клеток, причем гистиоцитарные элементы и фибробласты встречаются лишь в единичных препаратах.

Начало перехода раневого процесса в фазу регенерации в группе А (традиционного лече-

Таблица 1

Сравнительная оценка динамики течения раневого процесса по данным цитологических исследований у больных в группах А и Б на фоне лечения

Цитологические показатели течения раневого процесса	Сроки лечения (средний койко-день)					
	Группа А (n = 20)			Группа Б (n = 23)		
	исходно	через 5–7 дней	через 10–14 дней	исходно	через 5–7 дней	через 10–14 дней
РДИ	0,13±0,02	0,34±0,08*	1,28±0,13	0,16±0,02*	1,05±0,21*	2,72±0,23*
Одноядерные клетки	2,1±0,176	4,8±0,36*	8,25±0,4	2,52±0,28	9,78±0,61*	1,86±0,23*
Фибробласты	0,4±0,152	0,4±0,13*	1,0±0,18	0,652±0,23	2,7±0,47*	5,05±0,49*
Гистиоциты	0,1±0,1	0,25±0,123*	1,05±0,28	0,09±0,06	2,22±0,32*	3,36±0,47*

Примечание: *– $p< 0,001$;** – $p< 0,05$.

ния) отмечалось после 10–14-го дня, когда цитологическая картина раны характеризовалась регенеративным типом цитограмм, но только у больных с ХВН и ХИНК. У больных сахарным диабетом этот процесс затягивался. При этом в мазках преобладали сохранные формы нейтрофилов, а РДИ возрастал до единицы и выше (1,28). Появление фибробластов и гистиоцитов на фоне увеличения количества одноядерных клеток определяло начальные этапы развития грануляционной ткани (табл. 1).

На 10-14-й день лечения традиционным способом наблюдалась дифференциация единичных одноядерных клеток в гистиоцитарные элементы, с уменьшением их количества уже после 14-го дня, что свидетельствует об активизации репаративных процессов в ВГР и ТЯ при данном способе лечения лишь на третьей неделе (табл. 1).

Таким образом, при традиционном отношении к лечению ВГР и ТЯ можно констатировать факт достоверно замедленного течения фаз раннего процесса. Образование грануляционной ткани происходило на границе дермы и подкожной ткани на 14-20е сутки стандартного лечения. Грануляции были «вялыми» и слабо выраженными, особенно при СД и ХИНК. Активный рост грануляций отмечался с 25-28 суток. Эпителизация начиналась после 20 суток, с появления единичных очагов эпителизации. Восстановление эпидермального покрова завершалось на 35-58 сутки.

В группе Б (системное введение даларгина) динамика раневого процесса была более благоприятная (табл. 1): отсутствовали вторичные некрозы у больных СД. Очищение раны происходило уже к 5-10 суткам, в среднем на 7,24 день. Рост колоний микроорганизмов к 10 суткам практически не отмечался. С 7 суток в мазках-отпечатках преобладал регенеративно-воспалительный тип цитограмм, вначале у больных ХВН, а с 10 суток – у остальных, что свидетельствовало о переходе первой фазы раневого процесса во вторую. Появление грануляционной ткани регистрировалось на 8-14 сутки (в среднем на 10,42±0,3 сутки), эпителизация начиналась с 10 суток с появления очагов эпителизации (табл. 1). К 26-32 суткам (в среднем на 29,91±1,952 сут.) завершалась эпителизация раневой поверхности у 17 больных.

Одним из методов оценки течения раневого процесса является морфологическое исследование. В исходных биоптатах, взятых у больных до начала лечения, обнаруживались гнойно-фибринозные массы с разного размера «островками» грануляционной ткани, имеющей признаки деструкции: эндотелий сосудов, погибающий или уже погибший, десквамированный, очень часто отмечается наличие фибриновых тромбов в этих сосудах, их стенка утолщена, гомогенна. При постановке иммуногистохимической реакции с МКА к CD_{34+} обнаруживались иммунологические клетки овально-прогнутой формы, обладающие экспрессией эндотелина. При длительном существовании ТЯ в микропрепарате можно обнаружить также погибающие коллагеновые волокна.

Через две недели стандартного лечения в контрольной группе отмечено незначительное уменьшение площади дефекта ВГР и ТЯ (на 5-15 % относительно площади дефекта до лечения). В биоптатах обнаружено увеличение относительного объема грануляционной ткани, уменьшение объема некротических масс. В грануляционной ткани отмечались участки как молодого состояния, так и погибающие, с признаками деструкции, что может быть связано с недостаточной васкуляризацией грануляционной ткани, особенно у больных сахарным диабетом. Количество сосудов грануляционной ткани в поле зрения микроскопии при увеличении х400 колеблется в пределах 9-13 экз. При этом ядра эндотелиоцитов вытянутой формы, небольшого размера, средней и высокой степени гетерохромности. Экспрессия антигена CD_{34+} мало выражена, т.е. экспрессирующих CD_{34}-клеток не много. В отличие от биоптатов до лечения, экспрессия в эндотелиоцитах на фоне лечения приобретала точечный характер. С учётом динамики других показателей течения раневого процесса такое изменение экспрессии эндотелина отражает морфофункциональную активацию эндотелиоцита.

Проявлением качества кровоснабжения грануляционной ткани является уровень морфо-

функциональной активности фибробластов, что может быть оценено путем определения средней площади ядер фибробластов. В группе А (традиционное лечение) она составляет 182,0±5,3 мкм^2 (табл. 2).

Таблица 2

Средняя площадь ядер фибробластов в основной группе и группах сравнения на фоне лечения

Группа больных	Средняя площадь ядер фибробластов
Группа А	182,0±5,3 мкм^2
Группа Б	256,5±4,9 мкм^2

При использовании инъекций даларгина в дополнение к традиционному лечению (группа Б) за 2 недели площадь дефекта также уменьшилась, причем в большей степени, чем в группе А (традиционное лечение) (на 10,0-25,0 % относительно его площади до лечения). В биоптатах обнаружена большей частью молодая грануляционная ткань с более многочисленными, чем в контрольной группе, не только лейкоцитарными инфильтратами, а преимущественно макрофагальными. Обращало внимание наличие эозинофильных полинуклеаров в инфильтрате грануляционной ткани в данной группе больных. Интересным, не запланированным эффектом использования иммунохимической реакции с пероксидазной визуализацией, является обнаружение прокрашивания в коричневый цвет цитоплазмы тканевых базофилов, количество которых также было существенно увеличено в группе Б – с использованием даларгина. Количество сосудов грануляционной ткани в поле зрения х400 – 11-17 экз., ядра эндотелиоцитов диффузно гетерохромные. Повышения экспрессии антигена CD_{34+} в сосудах нет. Фибробластов в грануляционной ткани в данной группе было особенно много, их ядра имели еще большую площадь сечения, чем в контрольной группе: 256,5±4,9 мкм^2. Признаков вторичной альтерации грануляционной ткани также не обнаружено.

Оценивая особенности заживления ВГР и ТЯ в этой группе больных, можно сказать, что благодаря даларгину, вероятно, происходит стимуляция активности воспалительного процесса (путем воздействия на рецепторы тканевых базофилов к эндорфину) с увеличением миграции лейкоцитов через стенки капилляров, что служит, в первую очередь, утилизации некротических масс. Отсутствие существенной пролиферации капилляров обеспечивает относительный дефицит кислорода, что, как известно, стимулирует синтез коллагена фибробластами. Предполагаемой особенностью заживления раны при данном способе лечения может быть не только ускорение процесса, но и чрезмерная коллагенизация рубца.

Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии на заживление ВГР и ТЯ НК совместно применяемых полипептидного препарата даларгина и традиционных схем лечения.

Лечение даларгином на фоне традиционных схем лечения является более успешным, чем без него: продолжительность лечения при этом сокращается в 1,8-1,9 раза по сравнению с контролем.

Выводы

Применение даларгина в комплексном лечении ВГР и ТЯ НК стимулирует пролиферацию капилляров грануляционной ткани, миграцию фибробластов, усиливает их морфофункциональную активность, обеспечивает ускорение новообразования грануляционной ткани.

Сравнительная оценка клинической эффективности разработанного способа лечения с традиционным свидетельствует о следующих преимуществах разработанной методики: 1) сокращаются сроки очищения ран от некрозов; 2) сокращаются сроки появления активных грануляций; 3) сокращаются сроки начала краевой эпителизации. Наличие у разработанного способа вышеуказанных преимуществ позволяет сократить средние сроки стационарного лечения (среднего койко-дня) у данной категории пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артериализация венозного кровотока голени и стопы при окклюзии подколенно-берцового сегмента больных сахарным диабетом при критической ишемии нижних конечностей / Т. В. Розенкова, В. В. Краковский, О. А. Балацкий, Ю. Н. Юдакова // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2006. – Т. 12, № 1. – С. 119-122.

2. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. – [4 изд.]. – Л.: Медгиз, Ленингр. отдние, 1961. – 340 с.

3. Пат. України 39445, МПК (2006) А61В 10/00 Спосіб діагностики загоєння трофічної виразки нижньої кінцівки / Г.І. Губіна-Вакулик, Г. М. Герасимов; заявитель и патентообладатель Губіна-Вакулик Галина Іванівна, Герасимов Геннадій Миколайович – № 200811846 заявл. 06.10.2008, опубл. 25.02.2009, Бюл. № 4, 2009).

4. Раневое покрытие гелепран в лечении венозных язв / А. И. Кириенко, А. М. Шулутко, Л. И. Богданец [и др.] // Хирургия. – 2006. – № 4. – С. 71-72.

5. Салтыкова Л. Б. Иммунологические маркеры в гистологической диагностике лимфом / Л. Б. Салтыкова, Ю. А. Криволапов // Терапевтический архив. – 2002. – № 7. – С. 80-87.

6. Хугаева В. К. Влияние даларгина на микрогемо- и микролимфостимуляцию / В. К. Хугаева // Бюллетень эксперементальной биологии и медицины. – 1988. – № 3. – С. 300-302.

МОРФОЛОГІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ЗАСТОСУВАННЯ ДАЛАРГІНУ ПРИ ЛІКУВАННІ В'ЯЛОГРАНУЛЮЮЧИХ РАН І ТРОФІЧНИХ ВИРАЗОК НИЖНІХ КІНЦІВОК

С.О.Морозов, Г.М. Герасимов, О.В. Гречанов

Резюме. В роботі проведено вивчення імуногістохімічних характеристик ранового процесу в ВГР і ТЯ НК при системному введенні даларгіну. Також проведена оцінка клінічної ефективності традиційного способу лікування із використанням даларгіну у хворих на ВГР і ТЯ НК. Отримані результати дозволяють вважати, що застосування даларгіну в комплексному лікуванні ВГР і ТЯ НК стимулює проліферацію капілярів грануляційної тканини, міграцію фібробластів, підсилює їх морфофункціональну активність, забезпечує прискорення новоутворення грануляційної тканини.

Порівняльна оцінка клінічної ефективності розробленого способу лікування з традиційним свідчить про наступні переваги розробленої методики: 1) скорочуються терміни очищення ран від некрозів; 2) скорочуються терміни появи активних грануляцій; 3) скорочуються терміни початку крайової епітелізації. Наявність у розробленого способу вищевказаних переваг дозволяє скоротити середні терміни стаціонарного лікування (середнього ліжко-дня) у даної категорії пацієнтів.

Ключові слова: *імуногістохімічне дослідження, даларгін, в'ялогранулюючі рани, трофічні виразки.*

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE APPLICATION OF DALARGINUM IN TREATMENT OF SLUGGISHLY GRANULATING WOUNDS AND TROPHIC ULCERS OF THE LOWER EXTREMITIES

S.A. Morozov, G.N. Gerasimov, O. V. Grechanov

Summary. The work studied out the immunohistochemical characteristics of wound healing in sluggishly granulating wounds (SGW) and trophic ulcers of lower extremities (TULE) with systemic application of dalarginum. Also was evaluated the clinical efficacy of traditional treatment and using dalarginum patients with SGW and TULE. These results suggest that the use of dalarginum in treatment of SGW and TULE stimulates the proliferation of granulative tissue capillaries, the migration of fibroblasts, increases their morphofunctional activity, accelerates the formation of granulative tissue.

Comparative evaluation of the clinical efficacy of the developed method to the traditional treatment shows the following advantages of the developed method: 1) reduced time cleaning wounds from necrosis; 2) decreasing the time of appearance of active granulation tissue, and; 3) reduced time early edge epithelization. The presence of the above advantages of the developed method allows to reduce the average duration of hospitalization in these category of patients.

Key words: immunohistochemical investigation, dalarginum, sluggish granulating wounds, trophic ulcers.