

УДК 616.33-002.44-089.12-089.819

ПОЄДНАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ ТА МІНІІНВАЗИВНОЇ ХІРУРГІЇ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОЇ ВИРАЗКИ ШЛУНКА

О. Ю. Усенко, Я. В. Радьога, Д. І. Гребенюк, О. К. Стукан

Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України, м. Київ, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

COMBINATION OF CELLS TECHNOLOGIES AND MINSIINVASIVE SURGERY IN THE TREATMENT OF CHRONIC GASTRIC ULCER

O. Yu. Usenko, Ya. V. Radyoha, D. I. Grebeniuk, O. K. Stukan

Хронічна виразка шлунка є актуальною проблемою гастроентерології та хірургії. Частота її виникнення та тяжкого ускладненого перебігу постійно збільшується, незважаючи на оптимізацію підходів до консервативного лікування, хворих, впровадження у практику нових фармакологічних засобів [1 — 3].

Сучасні методи лікування виразок шлунка, як консервативні, так і хірургічні, спрямовані на створення оптимального балансу між факторами "захисту" та "агресії" слизової оболонки, що сприяє загоєнню виразкового дефекту [4]. Проте, ці підходи не впливають на перебіг репаративних процесів у стінці шлунка, що негативно впливає на перебіг захворювання в цілому. Вирішення цієї проблеми потребує використання нетрадиційних методів лікування.

Можливість локальної стимуляції репарації з використанням клітинних технологій активно обговорюється в сучасній літературі та підтверджується значною кількістю рандомізованих досліджень [5 — 9]. Перспективними напрямками вважають застосування ПЗТ як джерела факторів росту та/або АОЛ як донатора стромальних мезенхімальних поліпотентних стовбурових клітин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальне дослідження проведене на базі віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова відповідно до "Положення про викорис-

Реферат

Проаналізовані результати експериментального й клінічного застосування стимуляторів репаративних процесів (аутологічного очищеного ліпоаспірату —АОЛ та плазми, збагаченої тромбоцитами — ПЗТ) у лікуванні хронічної виразки шлунка. В експериментальній частині дослідження доведені переваги використання ПЗТ як донатора факторів росту. Продемонстровано її здатність стимулювати активність фібробластів та утворення судин в молодій сполучній тканині, що покращує оксигенацію тканин виразки та проліферацію клітин, диференціацію та прискорення дозрівання сполучної тканини і загоєння виразки. В клінічній частині дослідження показані переваги комбінованого лікування, що включало стандартну противиразкову терапію та ендоскопічне введення ПЗТв периульцерозну зону.

Ключові слова: виразка шлунка; ендоскопічна ін'єкційна терапія; ліпоаспірат; плазма, збагачена тромбоцитами.

Abstract

The results of experimental and clinical use of stimulants of local reparative processes (autologous purified lipoaspirate and platelet—rich plasma) in the treatment of chronic gastric ulcer were analyzed. In the experimental part of the study the benefits of using platelet—rich plasma as donator growth factors were proved. The ability to stimulate the activity of fibroblasts and vessels formation in the young connective tissue with improving of oxygenation in ulcers and enhancing of cell proliferation, differentiation and accelerating of connective tissue maturation and healing of ulcers were demonstrated. In clinical studies the advantages of combination of standard antiulcer therapy and local endoscopic injection of platelet—rich plasma compared to only conservative therapy were shown.

Key words: gastric ulcer; endoscopic injection; lipoaspirate; platelet—rich plasma.

тання тварин в біомедичних дослідженнях" з дозволу комітету з біоетики.

У дослідження включені 48 щурів лінії Wistar, обох статей, віком до 1 року, масою тіла від 120 до 220 г, у середньому (186 ± 17) г.

У 12 щурів (контрольна група) моделювали симетричне виразкове ураження шлунка. У дві основні групи включені 36 щурів, у яких моделювали симетричну виразку шлунка та стимулювали репаративні процеси у виразці передньої стінки шлунка. З метою прискорення репарації у 18 тварин (основна група 1) локально вводили АОЛ, у 18 (основна група 2) — ПЗТ.

Тварин утримували на стандартному раціоні з вільним доступом до води та їжі.

Симетричне виразкове ураження шлунка моделювали за модифікованою методикою S. Okabe з використанням авторського пристрою під наркозом кетаміном з розрахунку 0,22 мл на 100 г маси тіла тварин з використанням верхньо—середнього лапаротомного доступу. Стан сформованих виразкових дефектів оцінювали на 3—тю добу після моделювання, коли, за даними літератури, повністю формуються виразкові дефекти. Відбирали по 4 щури з кожної групи. Макроскопічно оцінювали стан стінок шлунка та черев-

ної порожнини, вимірювали площу сформованих виразкових дефектів передньої та задньої стінок шлунка за авторською методикою. Тварин виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців. Видаляли шлунок, здійснювали гастротомію, макроскопічно оцінювали стан слизової оболонки. Матеріал забирали для морфологічного дослідження.

Досліди з прискорення репарації проводили на 3—ту добу після моделювання симетричного виразкового ураження, коли, за даними морфологічного дослідження, формувалися виразкові дефекти з характерними ознаками. В стінку шлунка вводили стимулятори репарації з використанням голки калібру 30 G по периметру виразкового дефекту передньої стінки шлунка у 5 точках, розподіляючи весь об'єм (0,1 мл) порівну. Стимуляцію виразки задньої стінки шлунка не проводили, тобто, подвійно контролювали чистоту експерименту — у порівнянні з показниками у контрольній групі та у кожній дослідній тварини.

В основній групі 1 для стимуляції репарації використовували АОЛ як донатор поліпотентних мезенхімальних стовбурових клітин. Жирову тканину забирали у пахвинних ділянках щурів, *in vitro* інфільтрували розчином Klein, що готували за стандартною методикою (500 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, 20 мл 2% лідокаїну, 1 мл адреналіну 1:1000). Після механічного подрібнення жирової тканини в пробірку додавали 2 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, центрифугували зі швидкістю 2500 об./хв протягом 4 хв. Вміст пробірки розподілявся на 3 шари: верхній містив ліпіди, середній — клітинні елементи (АОЛ), нижній — строму та клітинні елементи крові. Середній шар відбирали в окремий шприц. Одразу після приготування АОЛ його трансплантували в об'ємі 0,1 мл, решту — направляли на морфологічне дослідження, забарвлювали гематоксилином та еозином, підраховували кількість клітин, що становила у середньому $(1,7 \pm 0,3) \times 10^5$ в 1 мл.

В основній групі 2 для стимуляції репарації використовували ПЗТ як

донатор факторів росту. Хвіст дослідної тварини обробляли ксилолом для розширення хвостових вен. В стерильну пробірку з розчином гепарину з розрахунку 10 ОД на 1 мл вводили 0,5 мл крові, центрифугували зі швидкістю 2500 об./хв протягом 8 хв. Вміст пробірки розподілявся на 2 шари: верхній містив ПЗТ, нижній — інші клітинні елементи крові. Верхній шар відбирали в окремий шприц, трансплантували в об'ємі 0,1 мл, решту матеріалу відправляли для морфологічного дослідження, підраховували кількість клітинних елементів. Кількість тромбоцитів у трансплантованому матеріалі становила у середньому $(1250 \pm 375) \times 10^9$ в 1 л, тобто, перевищувала кількість тромбоцитів в суцільній крові в нормі у 3 — 5 разів.

Результати експериментів оцінювали на 7—му та 14—ту добу після стимуляції репарації, визначали площу виразок, забирали матеріал для морфологічного дослідження.

Для оцінки морфологічних змін слизової оболонки шлунка експериментальний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Препарати готували за стандартною методикою, гістологічні зрізи товщиною 5 — 7 мкм фарбували гематоксилином та еозином, суданом—III, пікрофуксином за ван—Гізон, основним коричневим за Шубічем, основним коричневим у поєднанні з міцним зеленим барвником, проводили реакцію з ШЙК та альціановим синім. Проводили мікроскопію і фотографування гістологічних препаратів з використанням світлового мікроскопа Olympus BX 41 при збільшенні $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ і $\times 400$.

Клінічна частина дослідження проведена на базі ендоскопічного та хірургічного відділень Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М. І. Пирогова.

В дослідження включені 48 пацієнтів, у яких виявлено хронічну виразку шлунка середніх розмірів (поперечний розмір 1 — 2 см). Жінок було 28 (58,3%), чоловіків — 20 (41,7%). Вік пацієнтів від 27 до 65 років, у середньому $(46 \pm 7,8)$ року.

Пацієнти розподілені на групу порівняння (стандартна консерва-

тивна противиразкова терапія) та основну групу (стандартна консервативна противиразкова терапія доповнена ендоскопічним введенням ПЗТ). В основній групі було 14 пацієнтів (6 чоловіків і 8 жінок), в групі порівняння — 34 (14 чоловіків і 20 жінок).

Всі клінічні маніпуляції проводили після отримання письмової згоди пацієнтів.

Езофагогастроудоденоскопія проведена з використанням обладнання Olympus та Pentax. Під час ендоскопічного дослідження здійснювали експрес—біопсію для виключення малігнізації виразки шлунка.

У пацієнтів основної групи забирали кров з ліктьової вени в об'ємі 8 мл. ПЗТ готували у стерильних гепаринізованих скляних пробірках (вміст гепарину 14 — 20 ОД в 1 мл). Кров центрифугували зі швидкістю 1500 об./хв протягом 8 хв, одержували до 4,5 мл ПЗТ.

ПЗТ вводили з використанням ендоскопічних одноразових ін'єкційних пристроїв виробництва Olympus. Препарат вводили в периферійну зону в 5 рівновіддалених точок порівну.

Контрольну ендоскопію з біопсією у пацієнтів обох груп проводили на 7—му і 14—ту добу.

Дані експериментальних і клінічних досліджень обробляли з використанням пакета статистичних програм SPSS 20.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час експерименту всі тварини живі, активні, рухливі, адекватно реагували на зовнішні подразники, активно харчувалися. Особливих змін поведінки не було. При ревізії черевної порожнини перитоніт внаслідок перфорації стінки шлунка не виявлений.

На 7—му добу експерименту площа виразкових дефектів передньої та задньої стінок в контрольній групі становила відповідно $(10,0 \pm 1,04)$ та $(10,0 \pm 0,91)$ мм²; в основній групі 1 — $(9,5 \pm 1,47)$ та $(9,5 \pm 1,08)$ мм²; у дослідній групі 2 — $(9,8 \pm 1,3)$ та $(9,7 \pm 0,95)$ мм². За даними статистичного аналізу, достовірні відмінності показників у межах кожної

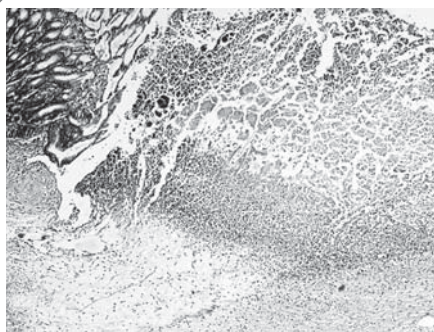


Рис. 1.
Мікрофото.
Край ацетатної виразки шлунка на 7-му добу.
Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.

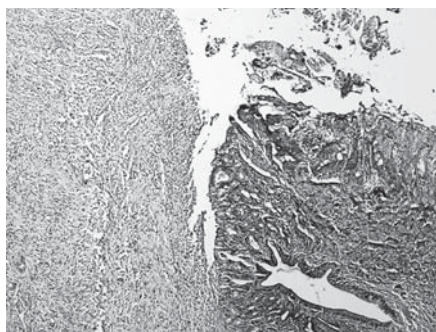


Рис. 2.
Мікрофото.
Сіаломуцини в цитоплазмі епітеліоцитів шлунка з нейтральними глікопротеїнами. Застосування АОЛ, 14-та доба.
ШЙК-реакція з альціановим синім. Зб. $\times 200$.

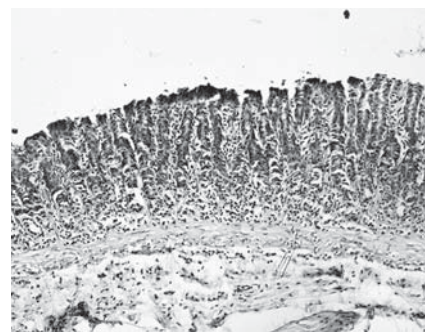


Рис. 3.
Мікрофото.
Повна епітелізація виразкового дефекту з незначною атрофією слизової оболонки шлунка та відновленням секреторної активності. Застосування ПЗТ, 14-та доба.
Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.

групи (порівняння площі виразкового дефекту передньої та задньої стінок) між групами не виявлені ($p > 0,05$).

На 14—ту добу в обох основних групах спостерігали значне зменшення розмірів виразкових дефектів передньої стінки шлунка, у деяких тварин — навіть їх повне загоєння.

Так, в основній групі 1 повне загоєння відзначене у 2 (28,6%) тварин, в основній групі 2 — у 5 (71,4%). В контрольній групі повне загоєння виразки не спостерігали.

Результати загоєння виразкових дефектів достовірно різнилися в основній групі 2 та контрольній групі ($p < 0,05$). Достовірні відмінності в основній групі 1 та контрольній групі не виявлені.

Площа виразкових дефектів передньої і задньої стінки шлунка становила відповідно: у контрольній групі — $(9,9 \pm 0,99)$ та $(10,0 \pm 0,91)$ мм², в основній групі 1 — $(4,3 \pm 3,03)$ та $(9,6 \pm 1,24)$ мм², в основній групі 2 — $(0,86 \pm 1,46)$ та $(9,57 \pm 1,2)$ мм².

У контрольній групі площа виразкових дефектів передньої та задньої стінок шлунка достовірно не різнилася ($p > 0,05$), що зумовлене відсутністю стимуляції репарації. В обох основних групах встановлені достовірні відмінності між аналогічними показниками ($p < 0,01$), тобто, стимуляція процесів регенерації у

виразкових дефектах передньої стінки шлунка за будь—яким методом сприяла достовірному ($p < 0,01$) прискоренню процесів загоєння виразок, зменшенню їх площі.

Встановлені достовірно кращі результати загоєння виразок шлунка в умовах локальної стимуляції репаративних процесів у порівнянні з контролем ($p < 0,01$). Також використання ПЗТ краще стимулювало процеси репарації, ніж АОЛ ($p < 0,05$).

За даними морфологічного дослідження, на 7—му добу значні відмінності загоєння виразкового дефекту у контрольній та основних групах не виявлені. Ацетатна виразка на поперечному розрізі мала форму усіченої піраміди, край виразки, звернений до стравоходу, підритий, слизова оболонка нависала над дефектом (рис. 1). В основній групі 2 як глибина, так і тяжкість запальної інфільтрації були достовірно меншими, ніж у контрольній групі.

На 14—ту добу в контрольній групі загоєння не спостерігали, відзначали прогресування виразкових змін, про що свідчили поява ділянок фібриноїдного некрозу, атрофія слизової оболонки, прогресивні збільшення кількості фіброblastів.

В основній групі 1 на 14—ту добу у виразці шар грануляційної

тканини найбільш виражений, шар некрозу практично повністю зникав. Виявлені склеротичні зміни, незначне розростання жирової тканини, що свідчило про приживлення аутографта. Секреторна активність епітеліоцитів шлунка досить низька, їх цитоплазма нерівномірно забарвлена, інколи не містила муцинів через їх вихід у просвіт виразки або незрілість. У складі секрету епітеліоцитів шлунка спостерігали нейтральні муцини (рис. 2).

В основній групі 2 епітелій в основному життєздатний (рис. 3). Цитоплазма його клітин помірно заповнена секретом, базофільна, що свідчило про велику кількість рибонуклеїдів. Спостерігали фігури мітотичного поділу.

Таким чином, результати проведеного макро— та мікроскопічних досліджень свідчили, що ПЗТ стимулює активність фіброblastів та утворення судин в молодій сполучній тканині, це сприяло покращенню оксигенації виразки та клітинної проліферації, диференціації та прискоренню дозрівання сполучної тканини і загоєння виразки.

В обстежених пацієнтів за даними ендоскопії після експрес—біопсії малігнізація виразки не виявлена. Виразкові дефекти мали типові ендоскопічні ознаки. Площа виразкових дефектів у хворих групи порівняння та основної групи достовірно

не різнилася ($p > 0,05$) і становила відповідно ($213,7 \pm 46,8$) та ($206,5 \pm 45,3$) мм².

За даними ендоскопічного дослідження на 7—му добу в обох групах виразкові дефекти збережені, ускладнення не спостерігали. У 2 хворих групи порівняння виявлене незначне збільшення площі виразки. Загалом площа виразкових дефектів в обох групах достовірно не різнилася ($p > 0,05$) і становила відповідно ($138,9 \pm 62,4$) та ($91,3 \pm 26,3$) мм².

На 14—ту добу площа виразкових дефектів у хворих групи порівняння становила у середньому ($84,8 \pm 75,5$) мм², в основній групі виразкові дефекти загоїлися, за даними ендоскопічного дослідження відзначали ознаки "червоного рубця".

Перебіг процесу загоєння в основній групі був достовірно швидшим, ніж в групі порівняння ($p < 0,01$).

Так, в групі порівняння на 14—ту добу повне загоєння виразкових дефектів відзначене у 8 (23,5%) пацієнтів, в основній групі — в усіх ($p < 0,01$).

За даними гістологічного аналізу біоптатів слизової оболонки морфологічні зміни в основному відповідали таким в експериментальних дослідженнях. На 14—ту добу молада сполучна тканина з невеликою кількістю грануляцій, відносно бідна судинами та фібробластами. Вона більш швидко епітелізувалася, тому набагато швидше трансформувалася у фіброзну тканину, особливістю було відновлення також м'язової

оболонки внаслідок проліферації міофібробластів. Об'єм фіброзної тканини менше 1/3 об'єму гладеньком'язової тканини.

ВИСНОВКИ

1. Репаративний ефект локального застосування ПЗТ, що проявлявся більш швидкою епітелізацією та відновленням м'язової оболонки, достовірно кращий ($p < 0,01$), ніж при застосуванні АОЛ.

2. Ендоскопічне введення ПЗТ на доповнення до стандартної консервативної терапії хронічної виразкової хвороби забезпечило достовірне ($p < 0,01$) прискорення процесу загоєння виразкових дефектів шлунка та досягнення їх повного загоєння в усіх пацієнтів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги. Пептична виразка шлунка та дванадцятипалої кишки у дорослих: Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 03.09.14 № 613.
2. Тутченко Н. И. Перфоративная язва желудка и двенадцатиперстной кишки / Н. И. Тутченко, И. В. Ключко. — К.: Лыбидь, 2009. — 208 с.
3. Фомин П. Д. Кровотечения из верхних отделов желудочно—кишечного тракта: причины, факторы риска, диагностика, лечение / П. Д. Фомин, В. И. Никишаев // Здоров'я України. — 2010. — №5. — С. 8 — 11.
4. Chai J. Peptic Ulcer Disease / J. Chai. — Rijeka: InTech, 2011. — 486 p.
5. Adipose stromal cells repair pressure ulcers in both young and elderly mice: potential role of adipogenesis in skin repair / A. L. Strong, A. C. Bowles, C. P. MacCrimmon [et al.]. // Stem Cells Translat. Med. — 2015. — N 4. — P. 632 — 642.
6. Coleman S. R. Fat grafting for facial filling and regeneration / S. R. Coleman, E. B. Katzel // Clin. Plast. Surg. — 2015. — N 3. — P. 289 — 300.
7. Effects of heterologous platelet—rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits / K. G. Abegao, B. N. Bracale, I. G. Delfim [et al.] // Acta Cir. Bras. — 2015. — N 3. — P. 209 — 215.
8. Role of adipose—derived stem cells in chronic cutaneous wound healing / G. Caruana, N. Bertozzi, E. Boschi [et al.] // Ann. Ital. Chir. — 2015. — N 1. — P. 1 — 4.
9. The effect of penile urethral fat graft application on urethral angiogenesis / M. Cakmak, I. Yazici, O. Boybeyi [et al.] // J. Pediatr. Urol. — 2015. — N 5. — P. 258.

