

УДК 616-008.9-002.4-005.1-08:617.58-089.12

## ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ ПО ПОВОДУ ЯЗВЕННО— НЕКРОТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ТКАНЕЙ НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

В. И. Киримов, И. Е. Барна, Н. Ф. Дрюк, И. П. Дмитренко

Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А. А. Шалимова НАМН Украины, г. Киев

## THE TREATMENT OF PATIENTS FOR ULCERATIVE— NECROTIC DEFECTS IN CHRONIC ISCHEMIA OF THE LOWER EXTREMITY TISSUES, USING BIOTECHNOLOGICAL METHODS

V. I. Kirimov, I. E. Barna, N. F. Dryuk, I. P. Dmitrenko

**А**мпутация конечности часто является неизбежными исходом лечения трофических язв и ишемического некроза у больных при критической ишемии тканей, обусловленной "нереконструктабельным" поражением артерий НК. Выполнение реконструктивно—восстановительных операций на сосудах у больных при критической ишемии тканей НК редко обеспечивает полное самостоятельное заживление трофических дефектов, а высокий риск возникновения тромботических осложнений при мультифокальном и/или дистальном поражении артерий может ухудшить состояние НК.

Применение рентгеноэндоваскулярных методов, а также современной консервативной терапии расширило возможности лечения, однако их эффективность у больных при поражении артерий голени и стопы непродолжительна, не всегда удается достичь заживления трофических и раневых дефектов [1].

Разработка и клиническое применение технологий клеточно—тканевой трансплантации и других биотехнологических методов открыли новые возможности и подходы к лечению таких больных.

В отделе микрососудистой, пластической и восстановительной хирургии накоплен многолетний опыт применения различных методов непрямого реваскуляризации. С 2005 г. в комплексе лечения больных применяют биотехнологичес-

### Реферат

Проанализированы результаты лечения 53 пациентов по поводу "нереконструктабельного" поражения артерий нижних конечностей (НК) и язвенно—некротических дефектов тканей их дистальных отделов. У 33 больных (основная группа) вводили выделенную фракцию мононуклеарных клеток (МК) костного мозга (КМ) и обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) путем множественных инъекций по периметру и в дно язвенно—трофического дефекта в сочетании с ауто трансплантацией аспириата костного мозга (АтАКМ) в ишемизированные ткани — мышцы голени; у 20 пациентов (группа сравнения) — осуществляли АтАКМ в ишемизированные ткани — мышцы голени и стопы. В сроки до 3 мес после оперативного вмешательства клиническое улучшение в основной группе отмечено у 25 (75,7%) пациентов, опорная функция НК сохранена у 90,9%; в группе сравнения — соответственно у 8 (40%) и 70%. Через 36 мес в основной группе опорная функция НК сохранена у 75,7% пациентов, в группе сравнения — у 50%. Использование предложенных биотехнологических методов у больных по поводу язвенно—некротических дефектов при хронической ишемии тканей НК способствовало активации процессов ангиогенеза, репарации и регенерации тканей, заживлению ран, оптимизации клинического течения заболевания.

**Ключевые слова:** облитерирующие заболевания сосудов нижних конечностей; критическая ишемия тканей; трансплантация аутологических клеточных материалов.

### Abstract

The results of treatment of 53 patients, suffering "unreconstructable" affection of the lower extremities (LE) arteries and ulcerative—necrotic defects in their distal parts tissues, were analyzed. In 33 patients (the main group) the allotted mononuclear cells fraction, the bone marrow and the plasm, enhanced by thrombocytes, were applied, using multiple injections along a perimeter and into the bottom of the ulcerative—trophic defect in combination with autotransplantation of the bone marrow aspirate into the ischemized tissues — the shin muscles; in 20 patients (the comparison group) — the autotransplantation of the bone marrow aspirate was accomplished into the ischemized tissues — the shin and the foot muscles. In terms up to 3 mo postoperatively a clinical improvement in the main group was noted in 25 (75.7%) patients, the bearing function of the LE was preserved in 90.9%; and in the comparison group — accordingly, in 8 (40%) and 70%. In 36 mo in the main group the bearing function of the LE was preserved in 75.7% patients, and in the comparison group — in 50%. Application of the biotechnological methods proposed in patients, suffering ulcerative—necrotic defects in chronic ischemia of the LE tissues, have promoted the angiogenesis processes activation, the tissues reparation and regeneration, the wounds healing, and the disease clinical course optimization.

**Key words:** obliterating diseases of the lower extremities vessels; critical ischemia of tissues; transplantation of autologous cellular materials.

кие методы, которые предусматривают АтАКМ, выделенной из него фракции МК, аспириата жировой ткани и выделенной из него клеточ-

ной стромально—васкулярной фракции клеток—предшественниц, а также ОТП, содержащей различные факторы роста и цитокины.

Цель исследования: улучшение результатов лечения больных по поводу хронической ишемии тканей и язвенно-некротических дефектов НК путем оптимизации процессов ангиогенеза и регенерации тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2009 по 2014 г. в клинике обследовали и лечили 53 пациента по поводу "нереконструктабельного" поражения артерий НК и язвенно-некротических дефектов дистальных отделов НК. Мужчин было 52, женщин — 1. Возраст больных от 49 до 71 года, в среднем 59,6 года. Длительность основного заболевания от 1,5 до 15 лет, в среднем  $(6,2 \pm 2,4)$  года. У всех больных диагностировано атеросклеротическое поражение сосудов НК, в том числе дистального сегмента голень—стопа (у 39 — обеих НК, у 14 — одной НК).

У 22 больных отмечено гнойно-деструктивное поражение тканей стопы, у 14 из них — на одной стопе, у 6 — на обеих; у 15 — ишемический некроз пальцев стопы, у 12 — хронические длительно не заживающие "немые" язвы. Более чем у 40% пациентов возникновение осложнений спровоцировано травматическим повреждением, в том числе различными хирургическими вмешательствами, выполненными ранее по месту жительства; последствиями ношения неадекватно подобранной обуви.

На момент госпитализации культя после ампутации НК на уровне переднего отдела стопы отмечена у 9 больных, голени — у 3, бедра — у 2. Окклюзия бедренно—подколенно—берцового сегмента обнаружена на 66 НК, подколенно—берцового — на 26. У 7 пациентов по данным рентгеноангиографии выявлен гемодинамически значимый стеноз подвздошного сегмента (у 3), бедренного сегмента (у 3), подколенной артерии (у 1), у 1 — окклюзия подвздошного сегмента.

У всех пациентов диагностированы сопутствующие заболевания, усугублявшие тяжесть их состояния: ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия — у 34, постинфарктное состояние — у 7, хро-

ническая гастропатия — у 15, поражение вен НК — у 3, сахарный диабет — у 16.

У 9 больных ранее были выполнены реконструктивно—восстановительные шунтирующие операции (на момент госпитализации диагностирован тромбоз шунта), у 2 — рентгеноэндovasкулярная дилатация участка локального стеноза проксимального артериального сегмента НК, результат удовлетворительный, у 4 — операции на венечных артериях. У 12 пациентов ранее были выполнены операции непрямой реваскуляризации НК: поясничная симпатэктомия — у 2; ротационная остеотрепанация большеберцовой кости — у 2; АТАКМ в мышцы голени и стопы — у 8, из них у 2 — дважды и трижды.

В соответствии с дизайном исследования, больные распределены на две группы: у 33 больных (основная группа) применяли выделенную аутологичную фракцию МК КМ и ОТП по периметру и в дно язвенно—трофического дефекта (участки локального некроза стопы и пальцев) в сочетании с АТАКМ в ишемизированные мышцы голени (по показаниям — в бедро и/или стопу). У 20 пациентов (группа сравнения) выполнена АТАКМ в ишемизированные ткани — мышцы голени и стопы в качестве монометода.

У больных основной группы в соответствии с классификацией 2—го Европейского консенсуса по хронической критической ишемии НК (1991), диагностирована хроническая ("критическая") ишемия тканей НК II — IV стадии — в 33 НК, II — III стадии — в 25 НК; в группе сравнения — соответственно в 20 и 14 НК.

Все пациенты обследованы в соответствии с диагностическим алгоритмом, который включал: тщательный анализ данных анамнеза заболевания, общие клинические, лабораторно—инструментальные исследования, доплероанометрическое измерение лодыжечно—плечевого индекса (ЛПИ) и регионального систолического давления голени (РСДГ). Исследования проводили до и через 3 мес после оперативного вмешательства, рентгеноконтрастную ангиографию НК — с обяза-

тельным исследованием дистального артериального русла.

У всех больных выявлены различные признаки трофического ишемического поражения стопы (локальные трофические язвы, некроз разной локализации и распространенности), боль в покое — у 70%, дистанция ходьбы до появления боли в среднем  $(65 \pm 10)$  м. ЛПИ и РСДГ у пациентов обеих групп составили в среднем соответственно  $0,28 \pm 0,05$  и  $(25 \pm 5)$  мм рт. ст.

Эксфузию аспириата костного мозга (АКМ) у пациентов осуществляли по разработанной технологии (методика, техника операции, инструментальное обеспечение) из крыла подвздошной кости (пат. Украины на полезную модель 12471, 12464) в объеме от 100 до 450 мл. Содержание клеток—предшественниц (стволовых гемопоэтических клеток) оценивали после операции с использованием метода проточной цитофлуориметрии по количеству маркера фенотипа CD34+ путем прямой иммунофлуоресцентной окраски. Концентрация клеток фенотипа CD34+ в АКМ у пациентов обеих групп составила в среднем  $(0,9 \pm 0,5) \times 10^6$  в 1 мл.

Пациентам основной группы из общего эксфузированного объема АКМ дополнительно отбирали 80 — 100 мл для последующего интраоперационного выделения фракции МК КМ в условиях операционного блока по методу Vouym (1968) в модификации клиники с использованием минимального технического и лабораторного обеспечения (лабораторная центрифуга, стерильные пробирки, пипетки, растворы оптической плотности 1,077).

Концентрация клеток фенотипа CD34+ выделенной фракции МК КМ у пациентов основной группы составила в среднем  $(2,2 \pm 0,5) \times 10^6$  в 1 мл. Общий объем фракции  $(10 \pm 2)$  мл.

Жизнеспособность клеток оценивали в камере Горяева с использованием трипанового синего или эозина Y (краситель не проникает через мембраны живых клеток, окрашивая только нежизнеспособные), живые клетки подсчитывали с помощью микроскопа.

Содержание живых клеток в АКМ и фракции МК КМ составило в среднем 97 — 98% у пациентов обеих групп.

Одновременно забирали кровь больного в объеме 80 — 100 мл с последующим выделением ОТП путем градиентного центрифугирования, получали от 6 до  $(10 \pm 2)$  мл общего объема ОТП, концентрация тромбоцитов  $(1\ 200\ 000 \pm 100\ 000)$  в 1 мл. Выделенную фракцию МК КМ и ОТП вводили путем нескольких инъекций (0,2 — 0,3 мл на 1 инъекцию) в ткани пальцев стопы, а также по периметру и в дно трофических дефектов или ран.

У пациентов основной группы концепция лечения хронических трофически—некротических дефектов НК, обусловленных хронической ишемией тканей при нереконструктабельном поражении артерий НК предусматривала анализ характера поражения артерий НК и распространенность поражения на стопу. Алгоритм сочетанного хирургического лечения характеризовался этапностью применения хирургических методов по поводу глубоких или поверхностных трофически—некротических дефектов тканей НК.

При глубоких трофических дефектах I этапом (стимуляция ангиогенеза в ишемизированных тканях НК и локальных регенераторно—репаративных процессов) выполняли АТАКМ в мышцы голени (по показаниям в бедро и/или стопу) в сочетании с инъекцией фракции МК КМ, ОТП по периметру и в дно язвенно—трофического дефекта; II этапом (через 7 — 10 сут) — иссекали нежизнеспособные ткани, раневую поверхность закрывали собственными тканями или искусственным покрытием, у некоторых — выполняли некрэктомии (ампутацию) пальца(ев) стопы. Повторно вводили ОТП; III этапом (через 7—10 сут после II этапа) закрывали раневой дефект собственной кожей (аутодермопластика) и/или повторно вводили ОТП в ткани стопы и пальцев.

При поверхностных трофических дефектах I этапом выполняли АТАКМ в мышцы голени, вводили

фракцию МК КМ, ОТП с одномоментным механическим очищением (дебридмент) раневого дефекта и закрытием раны искусственным покрытием; II этапом (через 7 — 10 сут) осуществляли пластику дефектов местными тканями или трансплантатом собственной кожи в сочетании с повторным введением ОТП, у некоторых больных по показаниям выполняли малую ампутацию НК на уровне стопы.

Хирургическое лечение пациентов группы сравнения включало первым этапом — АТАКМ в ишемизированные мышцы голени и стопы, затем некрэктомии, алло—аутодермопластику, малую ампутацию НК на уровне стопы или, в связи с обострением заболевания, высокую ампутацию НК.

Объем, вид, этапность оперативного вмешательства у каждого пациента устанавливали в соответствии с результатами клинических, функциональных исследований, рентгеноконтрастной ангиографии. Учитывали индивидуальные особенности: стадию ишемии тканей НК, объем и локализацию трофических изменений (дефектов) тканей, состояние пациента, наличие сопутствующих заболеваний. У некоторых пациентов при поражении артерий проксимального сегмента НК одномоментно или этапно с применением основных хирургических методов выполняли эндоваскулярное вмешательство или реконструктивно—восстановительные операции, направленные на улучшение проксимального артериального кровотока НК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты комплексного хирургического лечения оценивали на основе анализа субъективных (изменение характера жалоб, применение более мягких обезболивающих препаратов или полный отказ от них и т. д.) и объективных (эпителизация и спонтанное заживление больших трофических дефектов покровных тканей, уменьшение площади зон некроза и быстрое их отграничение, полное заживление ран или культы пальцев или стопы после

ампутации НК, сохранение опорной функции стопы, увеличение дистанции ходьбы до появления боли) клинических изменений, а также данных функциональных и инструментальных исследований: увеличение в динамике показателей ЛПИ, РСДГ, развитие артериальной сети коллатералей в ишемизированных тканях НК по данным рентгеноконтрастной ангиографии. Результаты оценивали в сроки 1 — 3, 12 и 32 — 36 мес.

Основной критерий удовлетворительного результата — сохранение опорной функции конечности и полное заживление ран; неудовлетворительного — ампутация НК.

Всем пациентам основной группы выполнены сочетанные хирургические вмешательства, включающие АТАКМ, инъекцию МК КМ и ОТП. У 17 (51,51%) больных одномоментно выполняли другие операции, в том числе некрэктомии на стопе — у 10, алло— или аутодермопластику трофических ран — у 3, ампутацию пальца(ев) стопы — у 4.

В раннем послеоперационном периоде у пациентов основной группы 55 раз повторно вводили ОТП в ткани стопы и пальцев НК, в том числе в качестве монометода — у 18 больных; с одномоментной кожной пластикой дефекта тканей — у 34; с ампутацией пальца(ев) стопы — у 2; переднего отдела стопы — у 1.

Кроме того, у 7 (21,21%) больных дополнительно после выполнения основного хирургического выполнено рентгеноэндоваскулярное вмешательство: дилатация участка гемодинамически значимого локального стеноза поверхностной бедренной артерии — у 3, дилатация и стентирование участка стеноза подвздошного сегмента — у 3, стеноза подколенной артерии — у 1. У одного пациента осуществлено подвздошно—бедренное протезирование.

Осложнений, связанных с применением анализируемых хирургических технологий, в раннем послеоперационном периоде не было.

В сроки от 1 до 3 мес клиническое улучшение в основной группе достигнуто у 25 (75,7%) пациентов,



из них значительное уменьшение интенсивности боли — у 20 (60,6%), устранение болевого синдрома — у 5 (15,1%). У 4 (12,2%) больных отмечено спонтанное заживление небольших трофических поверхностных язв пальцев стопы. Дистанция ходьбы до появления боли у пациентов основной группы увеличилась в среднем до 185 м.

Гемодинамические показатели в динамике от 1 до 3 мес после применения анализируемых хирургических технологий увеличились на 30% и составили в среднем: ЛПИ —  $0,40 \pm 0,04$ , РСТГ — ( $35 \pm 5$ ) мм рт.ст.

Опорную функцию НК в сроки до 3 мес удалось сохранить у 90,9% пациентов основной группы.

Пациентам группы сравнения в целях реваскуляризации ишемизированных тканей НК выполнено АТАКМ в мышцы голени и стопы только в качестве монометода. В раннем послеоперационном периоде этапная ампутация пальца(ев) стопы выполнена у 9 больных, некрэктомиа тканей стопы — у 4, кожная пластика дефектов покровных тканей стопы — у 7.

У 2 больных группы сравнения после операции возникли осложнения: неврит икроножного нерва, умеренный компартмент синдром голени. Они не представляли особой опасности, устранены путем симптомного лечения. В сроки от 1 до 3 мес клиническое улучшение отмечено у 8 (40%) пациентов, из них у 6 (30%) — значительное уменьшение выраженности болевого синдрома, у 2 (10%) — его полное исчезновение. Дистанция ходьбы до появления боли увеличилась в среднем до 90 м.

Гемодинамические показатели у больных группы сравнения в динамике наблюдения незначительно увеличились и составили в среднем: ЛПИ —  $0,33 \pm 0,03$ , РСДГ не изменился — ( $25 \pm 5$ ) мм рт.ст. Опорная функция НК в сроки до 3 мес сохранена у 70% пациентов.

В сроки до 12 мес наблюдения путем телефонного анкетирования и консультирования пациентов в клинике в связи с обострением заболевания и появлением очагов воспаления и некроза в области стопы

ампутация НК выполнена в основной группе у 4 (78,8%) больных, в группе сравнения — у 5 (60%). Устранение критической ишемии тканей НК, заживление трофических дефектов и ран в эти сроки отмечено у 90% пациентов основной группы и у 70% — группы сравнения.

В сроки 32 — 36 мес более чем у 40% пациентов обеих групп проведено повторное хирургическое лечение, включавшее применение анализируемых клеточных технологий для продления достигнутого положительного эффекта. Остальные пациенты консультированы путем телефонного анкетирования. В основной группе опорная функция НК сохранена у 75,7% пациентов, в группе сравнения — у 50%. Пациенты основной группы, которым, в дополнение к основному хирургическому лечению, выполнены вмешательства на проксимальных артериях НК в целях устранения стеноза или окклюзии, отмечали сохранение достигнутого удовлетворительного результата в сроки до 36 мес наблюдения.

По данным контрольной рентгеноангиографии артериального русла НК у 8 пациентов основной группы в сроки 10 — 12 мес после этапного хирургического лечения, включавшего введение выделенной фракции МК КМ, ОТП и АТАКМ, установлено наличие четко выраженной артериальной сети неоколлатералей в участках введения аспиринов, обогащение сосудистого рисунка дистальных сегментов НК, что обеспечивало достаточный кровоток для полного заживления ран и культи пальцев стопы.

Результаты лечения больных по поводу язвенно-некротических дефектов при хронической ишемии тканей НК в сроки 32 — 36 мес свидетельствовали об эффективности сочетанного применения МК, выделенных из собственного КМ, собственно АКМ и ОТП. МК являются, по сути, прогениторными клетками — предшественницами. АКМ содержит предшественницы различных клеток, а также цитокины и факторы роста. Введение таких субстратов в ишемизированные ткани способствует запуску одного из механизмов

репарации поврежденной ткани — неоангиогенеза [2] вследствие дифференцировки или слияния вводимых предшественниц проангиогенных клеток и паракринной стимуляции собственного ангиогенеза [3, 4].

ОТП содержит тромбоцитарные факторы роста (PRGF), представляющие биологически активные молекулы полипептидного происхождения. Они посылают специальные сигналы, воспринимаемые рецепторами, расположенными на поврежденных клетках. Клетки, получив сигнал, стимулируют деление, репаративную регенерацию [5]. Применение ОТП ускоряет заживление ран в несколько раз. Такая плазма безопасна, биосовместима, нет опасности заражения, так как ее выделяют из собственной крови больного.

Использование биотехнологических методов, включающих собственные субстраты и выделенные из них фракции, у больных по поводу язвенно-некротических дефектов при хронической ишемии тканей НК обеспечивает активацию процессов ангиогенеза, репарации и регенерации тканей, что способствует заживлению ран, улучшению клинического течения заболевания.

## ВЫВОДЫ

1. Методы аутологичной клеточно-тканевой трансплантации доступны для внедрения в клиническую практику, являются эффективной альтернативой неизбежной у большинства больных ампутации НК, что позволило сохранить опорную функцию конечности в сроки до 3 мес в основной группе — у 90,9%, в группе сравнения — у 70%; в сроки до 12 мес — соответственно у 78,8 и 60%; в сроки 32 — 36 мес — у 75,7 и 55%.

2. Представленные тактика, алгоритм и методы лечения безопасны, доступны, не требуют дорогостоящего обеспечения. Их использование перспективно также в сочетании с рентгеноэндоваскулярными методами и реконструктивными операциями на сосудах, а также в лечении ран и язвенно-раневых дефектов другого генеза.

