

© Решетняк О. М., Олейник А. Е., Пасечник А. В.

УДК 617.58: 616.14-002.44-036.12-08-091

*Решетняк О. М., Олейник А. Е., Пасечник А. В.*

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНИЧЕСКИХ ВЕНОЗНЫХ ЯЗВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

Харьковская медицинская академия последипломного образования (г. Харьков)

metide@ukr.net

Данная работа является фрагментом НИР «Комплексная профилактика гнойно-септических осложнений у больных неосложненными заболеваниями органов брюшной полости и мягких тканей», № государственной регистрации U0111U003580.

**Вступление.** В настоящее время традиционные методы лечения венозных язв эффективны в 75-80% случаев [4]. В тоже время, рецидив венозных язв при оперативном методе лечения составляет 4,8%-31,6% случаев [4].

Резистентность процесса заживления ВЯ к традиционным методам лечения при достижении компенсации кровообращения явилась основанием для поиска новых более эффективных средств для местного применения, которые обладают целенаправленным воздействием на репаративные процессы.

Перспективным направлением лечения хронических венозных язв является применение обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), стимулирующий эффект которой обусловлен высоким содержанием продуцируемых тромбоцитами естественных ростовых факторов, которые высвобождаются из альфа-гранул тромбоцитов [8]. В литературе имеются публикации о применении препаратов ОТП для лечения трофических язв различной этиологии, в том числе на фоне ишемии нижних конечностей [3]. Авторы показали высокую эффективность предложенной методики: под влиянием ОТП несмотря на ишемию тканей появлялись очаги краевой эпителизации, ускорялось очищение дна ран, уменьшилась их микробная обсемененность. Аналогичные результаты были получены Зининым В. Ю. и соавт. при лечении с помощью ОТП трофических язв венозной этиологии [2].

В то же время, Senet P et al. показали незначительную эффективность использования замороженных тромбоцитов при лечении хронических ВЯ [8]. По данным Crovetti et al. (2004 г.), McAleer et al.

(2006 г.), и Steenvorde et al. (2008 г.), частота закрытия язв составляет около 37.5% – 66%, а Gürgen M (2008 г.) достиг заживления трофических язв лишь в 50% случаев [5,8,9,10].

Несмотря на то, что ОТП используется для лечения трофических язв более чем 20 лет, за этот период эффективность метода оценивалась только по результатам клинических проявлений. В литературе найдены единичные данные, отражающие динамику гистоструктуры трофических язв под воздействием ОТП [7]. Таким образом, очевидна необходимость изучения морфологии венозных язв в ходе лечения.

**Цель исследования** – изучение динамики терапевтического патоморфоза венозных язв под воздействием препаратов ОТП.

**Объект и методы исследования.** В зависимости от варианта местного лечения венозных язв пациенты были распределены на 2 группы. В основную группу вошли 8 пациентов, в местном лечении которых использовали обогащенную тромбоцитами плазму по разработанной методике. Группу сравнения составили 8 пациентов, которым применяли стандартное лечение венозных язв в зависимости от фазы раневого процесса. Пациентам обеих групп, кроме того, первым этапом было выполнено патогенетически направленное хирургическое устранение вено-венозных рефлюксов с использованием миниинвазивных методик. Обе группы были репрезентативны по гендерным признакам, длительности заболевания и размерам язв. Биопсийный материал забирали из различных участков раневой поверхности на 7 и 28-е сутки лечения. Для микроскопического исследования было предоставлено по 16 биоптатов от 8 больных из каждой группы. Материалом для гистологического и иммуногистохимического исследования послужили иссеченные фрагменты ткани язв, которые фиксировали 10% забуференным формалином и подвергали парафиновой проводке. Парафиновые срезы

толщиной 5-8 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон, а также трихромом по Массону. Классический морфометрический анализ был проведен в соответствии со сложившимися принципами количественных морфологических исследований [1]. Микропрепараты изучались на микроскопе Carl Zeiss Primo Star при 100-, 200- и 400-кратном увеличении. Микрофотографии получены с помощью камеры AxioCam.

Иммуногистохимическим методом [6] выявляли: в тканях степень пролиферативной активности с использованием маркера пролиферативной активности ki 67, экспрессию коллагенов I, III и IV типов, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), маркер эндотелиальных клеток (CD 34), фактора роста фибробластов (FGF), эпидермального фактора роста (EGF), экспрессию высокомолекулярного цитофератина (Cytokeratin HMW), также определялись рецепторы к макрофагам (CD 68). Использовались мышиные моноклональные антитела (МКАТ) фирмы DAKO (Дания), Ready-to-Use. Демаскирующая термическая обработка выполнялась путем кипячения срезов в цитратном буфере (рН 6,0). Для визуализации первичных антител использовалась система детекции LSAB-2 System, HRP (стрептавидин-биотин-пероксидазный комплекс), фирма DAKO (Дания). В качестве хромогена использовался DAB (диаминобензидин). Подсчет количества клеток, которые демонстрировали интенсивное связывание пероксидазы в 1 мм<sup>2</sup> осуществлялся в 10 полях зрения, для оценки степени экспрессии антител использовали полуколичественную шкалу: + – слабая, ++ – умеренная, +++ – выраженная реакция.

Комплекс морфологических и морфометрических исследований проводился на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss) с использованием программ AxioCam (ERc 5s).

### **Результаты исследования и их обсуждение.**

Применение традиционной схемы лечения венозных язв (группа сравнения) на 7 сутки позволило установить 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, плазмочитами, полиморфноядерные лейкоциты были единичны или не обнаруживались совсем. Также обнаружено умеренное количество макрофагов. Эндотелиоциты, очагово выявляемые в грануляционной ткани, имели подострый характер, эндотелий сосудов демонстрировал умеренную пролиферативную активность. Коллаген IV типа выявлялся в виде четких петель, формирующих ажурные сетчатые структуры. Кроме того, в местах «гроздьевидного» строения грануляционной ткани выявлены 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. Помимо вышеописанного в тканях язвы можно было наблюдать появления участков реэпителизации в виде очагов пролиферирующего многослойного плоского эпителия, местами формирующих островки в толще созревающей грануляционной ткани, местами имеющих вид поверхностных пластов эпителиоцитов, как бы предпринимающих попытку создать покров для нижележащей грануляционной ткани. На границе новообразованного эпителиального пласта и нижележащей ткани иммуногистохимически обнаружена примитивная прерывистая базальная мембрана, представленная коллагеном IV типа.

В основной группе больных, где помимо традиционной схемы лечения язв было применено введение обогащенной тромбоцитами плазмы, выявлены следующие изменения. Отмечалось практически полное снижение отека грануляционной ткани, в сравнении с микропрепаратами контрольной группы, участки «гроздьевидного» строения выявлялись в единичных срезах, сосуды грануляционной ткани преимущественно приобрели вертикальную ориентацию. Установлено значительное снижение пролиферативной активности эндотелия сосудов грануляционной ткани, о чем свидетельствует низкая степень экспрессии CD 34. Воспалительная инфильтрация носила очаговый характер, а также инфильтрат обнаруживался в участках, где имело место сохранение «гроздьевидного» типа строения грануляционной ткани. Клеточный состав инфильтрата был представлен Т- и В-лимфоцитами.

Не было выявлено значительных изменений в соотношении различных представителей фибробластического домена, в сравнении с препаратами контрольной группы. Основными клеточными типами продолжали оставаться недифференцированные коллагенобласты с достаточно явным присутствием дифференцированных коллагенобластов, наличием коллагенокластов. Степень экспрессии различных типов коллагена также не имела значительных отличий от группы сравнения – были выявлены нежно петлистые сети коллагена IV типа и разбросанные депозиты коллагена I и III типов. Следует отметить, что экспрессия коллагена III типа была более выражена, в сравнении с группой контроля, что позволило судить о смещении пропорций содержания фибриллярных типов коллагена в пользу нарастания содержания III его типа.

Обращало на себя внимание значительное увеличение зон реэпителизации, в сравнении с препаратами контрольной группы. При этом многослойный плоский эпителий, проявляя достаточно высокую пролиферативную активность, демонстрировал достаточно четкую послойную дифференцировку эпителиоцитов. Также более «зрелый» вид имела базальная мембрана эпителия, образованная коллагеном IV типа. Экспрессия его умеренной степени выраженности (++) выявлялась на всем

протяжении эпителиального пласта, изредка чередуясь участками со слабой (+) степенью.

На 28 день исследования в биоптатах группы сравнения обращали на себя внимание 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. Обращала на себя внимание базальная мембрана эпителия, образованная коллагеном IV типа. Последний формировал плотные нефибриллярные структуры, повторяющие контур эпителиального пласта, с наличием своеобразного ветвящегося рисунка, что, с учетом с очень высокой степенью 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. Это подтверждено иммуногистохимическими реакциями с рецепторами к различным типам коллагена. Коллаген IV типа, в отличие от эпителиальной базальной мембраны выявлен в виде единичных очаговых мелких депозитов. Коллагены I и III типов имели вид достаточно объемных структур глыбчатого строения, лишенных правильной пространственной ориентации. Сохранялась диспропорция содержания коллагенов I и III типа со значительным перевесом в пользу коллагена I типа. В отдельных биоптатах установлено сочетание участков грубоволокнистого строения с участками умеренно выраженного отека дермы. Данное явление имело место в очагах активного неоваскулогенеза, 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 многочисленными. Также обнаружены коллагенокласты в виде отдельных представителей этого типа клеток, либо в виде небольших групп. В участках обнаружения 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 пациентов с венозными язвами, получавших комбинированную терапию (основная группа), взятых на 28-е сутки были выявлены 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 отличие от группы сравнения, в группе больных, лечение которых осуществляли с помощью ОТП обнаружены миофибробласты. Последние, помимо контракции новообразованной ткани, детерминируют пространственную ориентацию формирующихся пучков коллагеновых волокон. Коллагеновые волокна, состоящие из коллагенов I и III типов, представлены четко ориентированными пучками, лежащими параллельно эпидермальному слою. Количественно среди фибриллярных типов коллагена по-прежнему преобладал коллаген I типа, однако, в сравнении со всеми предыдущими группами исследования, 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 слои, при этом признаков кератинизации блестящего и рогового слоев не выявлено.

Обращает на себя внимание высокая пролиферативная активность базального слоя, что характерно для очагов реэпителизации, а также увеличенное, в сравнении с нормальной кожей, число меланоцитов. Плотность дермы в биоптатах больных основной группы достаточно равномерна. В отличие от группы сравнения в биоптатах не обнаружено чередования очагов грубого склероза с участками отека. Сосуды дермы имеют округлой формы просветы, правильно сформированную стенку, компактный уплощенный эндотелий. Воспалительной инфильтрации, в том числе и периваскулярной, так же не отмечено, однако, обнаружены в небольшом количестве макрофаги, имеющие признаки фагоцитарной активности.

Таким образом, патогенетически направленное хирургическое лечение с совместным применением обогащенной тромбоцитами плазмы ведет к ускорению созревания грануляционной ткани и ускорению реэпителизации язвенного дефекта, что проявляется уже на 7 сутки с момента начала лечения. В препаратах группы сравнения на 28-е сутки обнаружена грубоволокнистая соединительная ткань с несовершенным ангиогенезом, что представлено чередованием участков фиброза с участками отека. Все это покрыто эпителием с явлениями значительной пролиферативной активности, акантоза, с признаками субэпидермальной воспалительной реакции. Подобная картина определяет незавершенность репарации и нестабильность тканевых параметров, что при создании должных патологических условий, может служить причиной для рецидива язвы.

В эти же сроки в препаратах основной группы можно отметить проявление признаков физиологической регенерации – адекватный ангиогенез, фибриллогенез с правильной ориентацией коллагеновых фибрилл и полную реэпителизацию. Вышеперечисленное, создает условия для заживления венозной язвы и делает возможность ее рецидива маловероятной.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно сделать следующие **выводы**:

1. Применение препаратов ОТП ведет к снижению отечно-воспалительных процессов в хронической венозной язве и ускорению ее реэпителизации, что проявляется уже на 7-е сутки лечения.

2. На 28-е сутки лечения в препаратах основной группы отмечено значительное увеличение признаков репаративных процессов, в сравнении с группой сравнения, что проявляется в отсутствии явлений воспаления, отека, деформирующего склероза, способных дестабилизировать терапевтический эффект и вызвать рецидив хронической язвы.

3. Морфологические проявления терапевтического патоморфоза при применении препаратов ОТП связаны с обеспечением физиологической регенерации тканей хронической венозной язвы, что проявляется нормализацией соотношения фибриллярных типов коллагена, отсутствием очагов атипичной локализации коллагена, адекватным ангиогенезом и реэпителизацией.

### **Перспективы дальнейших исследований**

Необходимы дальнейшие морфологические и иммуногистохимические исследования по оценке эффективности использования обогащенной тромбоцитами плазмы совместно с аутодермопластикой при лечении венозных язв.

## Литература

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Зинин В.Ю. Использование богатой тромбоцитами плазмы (БотП) 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». – Новосибирский государственный медицинский университет. – Москва, 21-24 февраля 2008. – С. 265-266.
3. Крайник И.В. 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. Хрупкин В.И. Дерматопластика раневых дефектов / В.И. Хрупкин, В.Ф. Зубрицкий, А.Н. Ивашкин [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 195 с.
5. Crovetti G. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds / G. Crovetti, G. Martinelli, M. Issi [et al.] // Transfus. Apher. Sci. – 2004. – Vol. 30. – P. 145-151.
6. Dabbs D. Diagnostic immunohistochemistry / D. Dabbs. – 3rd ed. – Philadelphia, 2010. – 952 p.
7. Farahat A. Evaluation of the clinical and histopathological effect of Platelet rich plasma on chronic wound healing / A. Farahat, E.H. Salah, Mubarak AL-Shraim // J of Basic and Clinical Studies. – 2014. – Vol. 2, № 6. – P. 55-61.
8. Gьrge M. Treatment of chronic wounds with autologous platelet-rich plasma / M. Gьrge // EWMA Journal. – 2008. – Vol. 8, № 2. – P. 5-10.
9. McAleer JP. Efficacy of concentrated autologous platelet-derived growth factors in chronic lowerextremity wounds / JP. McAleer, E. Kaplan, G. Persich // J. Am. Podiatr. Med. Assoc. – 2006. – Vol. 96. – P. 482-488.
10. Stenvorde P. 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.

УДК 617.58: 616.14-002.44-036.12-08-091

### **МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХРОНІЧНИХ ВЕНОЗНИХ ВИРАЗОК ПІД ВПЛИВОМ ПРЕПАРАТІВ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ**

**Решетняк О. М., Олійник О. Є., Пасічник О. В.**

**Резюме.** Досліджували динаміку терапевтичного патоморфозу венозних виразок під впливом препаратів збагаченої тромбоцитами плазми з використанням сучасних імуногістохімічних методик із застосуванням моноклональних антитіл на 7-у і 25-у добу лікування. Згідно з отриманими результатами дослідження, застосування збагаченої тромбоцитами плазми у комплексному лікуванні венозних виразок створює нові, більш вигідні умови для протікання репаративних процесів у виразці, що впливає на темпи, якість дозрівання і диференціювання як епітеліального так і сполучнотканинного регенератів.

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

УДК 617.58: 616.14-002.44-036.12-08-091

### **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНИЧЕСКИХ ВЕНОЗНЫХ ЯЗВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ**

**Решетняк О. М., Олейник А. Е., Пасечник А. В.**

**Резюме.** Исследовали динамику терапевтического патоморфоза венозных язв под воздействием препаратов обогащенной тромбоцитами плазмы с использованием современных иммуногистохимических методик с применением моноклональных антител на 7-е и 25-е сутки лечения. Согласно полученным результатам исследования, применение обогащенной тромбоцитами плазмы в комплексном лечении венозных язв создает новые, более выгодные условия для протекания репаративных процессов в язве, что влияет на темпы, качество созревания и дифференцировки как эпителиального так и соединительнотканного регенератов.

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

UDC 617.58: 616.14-002.44-036.12-08-091

### MORPHOLOGICAL FEATURES OF CHRONIC VENOUS ULCERS UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS PLATELET RICH PLASMA

**Reshetniak O. M., Olejnik A. E., Pasechnik A. V.**

**Abstract.** Was investigated the dynamics of therapeutic pathomorphosis of venous ulcers under influence of platelet rich plasma.

Patients was divided on two groups. In the main group was included 8 patients that was treated with help of PRP by developed methodic. Comparing group was include 8 patients, that was threated by the standart methodic on a basic of phase of wound process. Biopsies was taken from different part of the wound surfase on 7th and 28th day of threatment. It was used modern immunogystochemical methodics that include using of monoclonal antibodies to markers of proliferative activity ki 67, collagens I, III and IV types fibroblasts growth factor, vessel endothelial growth factor(VEGF), endothelial cell factor (CD34), epidermal growth factor, macromoleculare cytotkeratin (Cytokeratin HMW), also was define receptors to macrophages (CD68).

According to received data pathogenetically directed surgical treatment with combined use of the PRP accelerate the maturation of granulation tissue and accelerate re-epithelialization of the ulcer, which is already apparent on the 7-th day after initiation of treatment. In preparates of comparing group on 28-th day was found coarse-fibered connective tissue with deficient angiogenesis, which is represented by alternating areas of fibrosis with edema areas. All of it is covered with epithelium and presence of significant proliferative activity, acanthosis, subepidermal with signs of inflammatory reaction. This pattern determines the incompleteness of the tissue repair and insability of tissue parameters that in proper pathological conditions may be the cause for recurrence of ulcer. In the same period in the preparates of the main group it is possible to note the appearance of signs of physiological regeneration: adequate angiogenesis, fibrillogenesis with the correct orientation of collagen fibrils and complete re-epithelialization. From the above, we can say that our methodic create conditions for healing venous ulcers and reduce the possibility of relapse.

Thus, based on these data, we can make the following conclusions:

1. Using of platelet rich plasma lead to decrease of swelling and inflammation in chronic venous ulcers and accelerated re-epithelialization, which is already apparent on the 7th day of treatment.

2. On the 28th day of treatment in the preparates of the main group was observed a significant increase in signs of reparative processes, in comparison with the comparison group, which is manifested in the absence of inflammation, swelling, deforming sclerosis that could destabilize the therapeutic effect and cause the recurrence of chronic ulcers.

3. Morphological manifestations of therapeutic pathomorphism in use of platelet rich plasma drugs associated with the provision of physiological tissue regeneration of chronic venous ulcers, which manifes by normalization of the ratio of fibrillar types of collagen, absance of foci of atypical collagen localization, adequate angiogenesis and re-epithelialization.

**Keywords:** platelet rich plasma, venous ulcers, immunogystochemical methodics.

*Рецензент – проф. Белов С. Г.*  
Стаття надійшла 14.03.2016 року