

УДК 616.718.-002-08:616-036.21:615.273.53

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СТИМУЛИРУЮЩИХ АУТОФАКТОРОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МЕСТНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ЯЗВЕННЫХ ПРОЦЕССОВ

А. Ю. Михайлов<sup>1</sup>, В. В. Проничев<sup>2</sup>, А. А. Соловьев<sup>2</sup>, С. Н. Стяжкина<sup>2</sup>,  
М. Л. Черненкова<sup>2</sup>, А. В. Леднева<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Городская клиническая больница № 6,

<sup>2</sup>Ижевская государственная медицинская академия, г. Ижевск, Россия

## EFFICIENCY OF USING STIMULATING AUTOFACTORS FOR REGENERATION OF LOCAL INFLAMMATORY AND ULCEROUS PROCESSES

A. Yu. Mikbailov<sup>1</sup>, V. V. Pronichev<sup>2</sup>, A. A. Soloviev<sup>2</sup>, S. N. Styazbkina<sup>2</sup>,  
M. L. Chernenkova<sup>2</sup>, A. V. Ledneva<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>City Clinical Hospital № 6,

<sup>2</sup>Izhevsk State Academy of Medicine, Izhevsk, Russian Federation

---

**Цель.** Определить эффективность стимулирующих аутофакторов в лечении трофических язв кожи.

**Материалы и методы.** В статье представлены результаты цитологической картины лечения трофических язв нижних конечностей. Анализ проведен по результатам исследования 65 пациентов, получивших комплексное консервативное лечение трофических язв нижних конечностей, и 65 пациентов при включении в комплексное консервативное лечение стимулирующих аутофакторов – аутоплазменного гепаринового преципитата, содержащего повышенный градиент концентрации фибронектина и аутокератиноцитов. Обе группы в своем составе имели пациентов с трофическими язвами при синдроме диабетической стопы и пациентов с трофическими язвами при венозной патологии.

**Результаты.** Определены различия в регенерационной цитологической картине трофических язв при синдроме диабетической стопы и при трофических язвах венозной этиологии.

**Выводы.** Предложенный способ лечения трофических язв нижних конечностей является эффективным и может быть рекомендован к применению в практической медицине.

**Ключевые слова.** Трофическая язва, аутоплазменный гепариновый преципитат, стимулирующие аутофакторы, регенерация.

**Aim.** To determine the efficiency of stimulating autofactors in treatment of trophic skin ulcers.

**Materials and methods.** The results of cytological picture of treatment of lower extremity trophic ulcers are presented in the paper. Analysis was carried out by the results of studying 65 patients who received

---

© Михайлов А. Ю., Проничев В. В., Соловьев А. А., Стяжкина С. Н., Черненкова М. Л., Леднева А. В., 2014

e-mail:lrkb@udmnet.ru

тел. 8 (3412) 46-23-95

[Михайлов А. Ю. – врач; Проничев В. В. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии; Соловьев А. А. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии; Стяжкина С. Н. – доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской хирургии; Черненкова М. Л. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии; Леднева А. В. (\*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры факультетской хирургии].

complex conservative treatment of lower extremity trophic ulcers and 65 patients with complex conservative treatment added by stimulating autofactors – autoplasmic heparin precipitate containing elevated gradient of fibronectin and autokeratinocyte concentration. Both groups included patients with trophic ulcers against the background of diabetic foot syndrome and patients with trophic ulcers of venous pathology.

**Results.** Differences in regeneration cytological picture of trophic ulcers in case of diabetic foot syndrome and those of venous pathology were determined.

**Conclusions.** The offered method of treatment of lower extremity trophic ulcers is effective and can be recommended for practical medicine.

**Key words.** Trophic ulcer, autoplasmic heparin precipitate, stimulating autofactors, regeneration.

## ВВЕДЕНИЕ

Лечение трофических язв (ТЯ) нижних конечностей представляет сложную медико-социальную проблему. ТЯ отличаются малой тенденцией к заживлению, частыми рецидивами, сложностью и высокой стоимостью лечения, значительной распространенностью [13, 14]. Больные с ТЯ венозной этиологии составляют 2 % в современной популяции взрослого населения, у лиц старше 65 лет их число может достигать 3–4 %.

Проблема лечения трофических язв венозной этиологии (ТЯВЭ) не является в настоящее время решенной, отсутствие эффекта от проводимого лечения наблюдается у 70 % больных, получающих консервативное лечение. В данной группе высоки сроки временной нетрудоспособности, приводящей в 12,5 % к стойкой утрате трудоспособности [11].

Возрастает число больных с ТЯ как наиболее частым проявлением синдрома диабетической стопы (СДС). На 01.01.2012 г. в мире зарегистрировано 366 000 000 больных сахарным диабетом (СД), к 2025 г. прогнозируется увеличение этого числа до 380,0 млн человек. В России на 01.01.2012 г. по данным государственного регистра этим заболеванием страдает 3 549 203 человека, однако их количество может достигать 10 млн, а к 2025 г. прогнозируется увеличение этого числа до 380,0 млн [4, 10].

По данным многих авторов, количество пациентов, страдающих длительно незаживающими трофическими язвами различной

этиологии, в общей популяции достигает 2–6 % [3, 15].

В заживлении ТЯ как варианта течения раневого процесса, независимо от происхождения, действуют одни и те же биологические законы, в репарации участвуют однотипные клеточные механизмы [7]. В настоящее время активно применяются различные технологии лечения ТЯ с помощью разнообразного клеточного материала. Одним из условий успешности трансплантации клеточного материала является полнота адгезии его на раневой поверхности. Белки внеклеточного матрикса различаются по степени взаимодействия с первичными кератиноцитами кожи человека, особенно на коротких сроках взаимодействия (до 30 минут) [9]. Многие авторы отмечают большую роль фибронектина в обеспечении жизнеспособности кератиноцитов. Последний стимулирует миграцию кератиноцитов, является наиболее благоприятной средой для роста, регулирует сбалансированность фибробластических процессов [4, 9, 12]. Описано положительное действие плазменного аутофибронектина в лечении больных с ТЯВЭ [4, 8].

Доказательством специфического участия фибронектина в заживлении ран служит закономерный характер изменения концентрации его в раневом отделяемом [5]. Уменьшение количества фибронектина в ране обуславливает выпадение ряда функций, в частности, нарушение опсонизации микроорганизмов и, как следствие, снижение напряженности фагоцитоза. Одной из мер регуляции раневого процесса может

быть введение эндогенного фибронектина, полученного из плазмы крови [5, 6].

Таким образом, одним из способов сохранить адгезию и дальнейшую пролиферацию клеточного материала, трансплантируемого на раневую поверхность, может быть создание «подложки», способствующей процессам регенерации и эпителизации, в частности, за счет повышения градиента концентрации фибронектина в ране. Данный факт играет большую роль в регенерации кожи у больных СД, у которых в первой фазе раневого процесса удлиняются сроки резорбции и отторжения некротических тканей в ране. Во второй фазе затягивается процесс образования аргирофильных и коллагеновых волокон, тормозится пролиферация фибробластов и созревание грануляционной ткани [1].

В заживлении ран большое значение имеют митогены, или ростовые факторы, почти все известные факторы содержатся в плазме крови. Однако есть основания полагать, что ростостимулирующие пептиды и белки могут быть выделены из различных тканей [2, 8]. При определенных условиях показано, что самоподдержание культуры кератиноцитов в среде, лишенной ростовых факторов, возможно. Это свидетельствует о том, что одно или несколько биологических веществ, стимулирующих пролиферацию клеток, продуцируются самими кератиноцитами [3].

Нами разработан и обоснован метод местного лечения в комплексной терапии ТЯ, являющийся достаточно эффективным, малозатратным и лишенным некоторых недостатков существующих методов.

*Цели исследования* – оценить цитологическую картину при лечении трофических язв нижних конечностей при применении предлагаемого способа с помощью стимулирующих аутофакторов; определить отличия в регенераторной способности трофических язв при синдроме диабетической стопы

и при трофических язвах венозной этиологии; оценить эффективность метода в лечении трофических язв кожи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период 2010–2013 гг. на базе отделения гнойной хирургии ГКБ № 6 г. Ижевска проведено комплексное обследование и лечение по предлагаемой методике 65 пациентов с ТЯ нижних конечностей. Данные больные составили основную группу – *n1*. Группа дополнительно к комплексному лечению ТЯ нижних конечностей получала местное лечение стимуляторами репаративного процесса: аутоплазменным гепариновым преципитатом (ППП) и аутокератиноцитами, получаемыми путем кожной экскорииации. Данный материал в дальнейшем именуется кожный экскориаат (КЭ). На эту методику получен патент РФ № 2484837 от 18.08.2011 г. Группа *n1* была неоднородна по этиологии язвенного процесса. В ней имелась подгруппа *n1a* – 37 человек (57,0±6,1 %) с ТЯ как проявлением СДС и подгруппа *n1б* – 28 (43,0±6,1 %) с ТЯВЭ. Среди пациентов, включенных в исследование, в основной группе было 29 мужчин (44,6±6,1 %), 36 женщин (55,4±6,3 %). Для анализа полученных результатов была определена группа сравнения, идентичная основной по количеству: 37 больных с ТЯ при СДС, 28 человек с ТЯВЭ. Идентичность соблюдена также по возрасту, полу, основным характеристикам язвенного процесса.

Таким образом, общее количество обследованных – 130. В основной группе все больные с СДС страдали СД 2-го типа, получали инсулин, длительность СД не менее 5 лет. Больные с СДС по классификации Wagner имели 1-ю и 2-ю степень – у 31 (84,0±8,3 %) пациента, у 6 (16,0±6,0 %) – 3-я степень, без развития остеомиелита. По выраженности клинических синдромов: у 22

(59,5±8,0 %) человек – смешанная форма СДС, у 5 (13,5±5,6 %) – ишемическая, у 10 (27,0±7,2 %) – нейропатическая. Площадь язвенного дефекта при СДС варьировалась от 1,5 см<sup>2</sup> (в случае нахождения на фалангах пальцев стоп) до 26 см<sup>2</sup> при наличии на подошвенной поверхности. Большинство язв имело округлую или близкую к округлой форму, ровные края. Глубина язвенного дефекта от 0,2 до 0,6 см. Вне зависимости от этиологических факторов для оценки площади язвы применяли классификацию В. Я. Васюткова.

Изучение цитологических препаратов проведено на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии человека Ижевской государственной медицинской академии. Исследованы цитологические препараты больных, получающих лечение стимулирующими аутофакторами, – 9 человек с ТЯВЭ, 10 – с СДС. Контрольную группу составили 12 человек – 8 с СДС и 4 с ТЯВЭ. Исследование проведено путем изучения мазков-отпечатков, взятие которых проводилось до начала лечения, на 5-е сутки (в группе исследования этот день совпадает с наложением стимулирующих аутофакторов – ППП и КЭ), на 10, 15-е и 17, 22-е сутки. Исследование проводили по методу М. П. Покровской и М. С. Макарова в модификации Д. М. Штейнберга (1948).

Препараты готовили следующим образом: стерильные обезжиренные предметные стекла прикладывали к центру язвенной поверхности, фиксировали путем высушивания на воздухе, окрашивали азурином по Романовскому в течение 3 минут, дифференцировали в дистиллированной воде с последующим высушиванием. Полученные препараты изучали в биологическом микроскопе при увеличении объектива ×40, одновременно проводили фотосъемку с помощью web-камеры «Микро». Результаты оценивали по количеству клеток на единицу площади, по состоянию типов клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные позволили сделать заключение, что для больных СДС и ТЯВЭ до проведения лечения характерны дистрофические процессы. По всем основным показателям цитограммы соответствовали 1-му типу по классификации Д. М. Штейнберга. Данный тип характеризует раны с выраженным снижением иммунобиологической резистентности макроорганизма. Макроскопически язвенная поверхность соответствует 1-й фазе раневого процесса (фазе экссудации), грануляционная ткань в дне язвы отсутствует. Язвенная поверхность покрыта гнойным детритом, имеется гнойно-серозное отделяемое. Экссудативные процессы более выражены для ТЯВЭ.

При цитологическом исследовании мазков-отпечатков в этот период выявлено большое количество погибших нейтрофильных лейкоцитов. Другие формы лейкоцитов присутствуют незначительно, имеются микробные тела, эритроциты.

В дальнейшем при исследовании мазков-отпечатков с язвенной поверхности больных, получавших традиционное лечение, отмечается, что в течение первых 2 недель уровень регенерации выражен незначительно. Уменьшается число погибших нейтрофилов, появляются лимфоциты, макрофаги, единичные кератиноциты.

Характерно, что с 5-х суток и до окончания лечения во всех мазках-отпечатках сохраняются эритроциты различной степени зрелости. Данный факт рассматривается нами как косвенное проявление нарушения репаративных взаимодействий, свидетельствует о незрелости соединительной ткани, неполноценности сосудистой стенки грануляций, которая травмируется в момент взятия мазков-отпечатков.

В основной группе при применении стимулирующих аутофакторов – аутоплазменного гепаринового преципитата и ауто-

кератиноцитов – прослеживается положительная динамика в более короткие сроки. На 10–12-е сутки уменьшается количество микробных тел до 0, 1, нейтрофилов – до 1 в поле зрения. Появляются лимфоциты и макрофаги. Это соответствует переходу дегенеративно-воспалительного типа к воспалительно-регенераторному типу цитограмм. Применяв классификацию М. Ф. Камаева (1954) различных типов цитограмм, мы обнаружили разницу в цитологических картинах ТЯ при ТЯВЭ и при СДС. Для язв при СДС в начальных стадиях характерен дегенеративно-некротический тип цитограмм, отмечается дегенеративное изменение лейкоцитов, однако большая часть материала представлена некротическими массами. В дальнейших отпечатках контрольной группы наблюдается длительно сохраняющееся скопление некротического детрита. В ТЯВЭ преобладает дегенеративно-воспалительный тип, характерно большое количество дегенеративно измененных полиморфноядерных лейкоцитов, элементы детрита представлены в меньшем объеме, чем при СДС.

К концу второй недели у большинства больных (7 – с ТЯВЭ и 9 – с СДС) воспалительно-регенераторный тип цитограмм заменяется регенераторно-воспалительным. В исследованных полях исчезают детрит, микробные тела. Характерным признаком является выраженная эпителизация.

В группе сравнения развитие регенераторных гранул и краевая эпителизация среди пациентов с благоприятным исходом становится ведущим процессом только на 3-й неделе. При этом никогда эпителизация не наблюдалась в препаратах, взятых с центральной части язвенной поверхности. Эпителиоциты отмечались только в мазках-отпечатках, взятых с участков краевой эпителизации.

При традиционном лечении у большинства больных (6) первые признаки регенера-

торной фазы появились только через месяц от начала лечения. У 4 пациентов после отмены антибактериальной, противовоспалительной терапии к концу 3-й недели цитологическая картина регрессировала – вновь стали выявляться нейтрофильные лейкоциты различной степени регенерации, белково-липидные дегенеративные комплексы, микробные тела.

Кератиноциты, взятые по авторской методике в день исследования и помещенные в раствор Рингера, исследовались с помощью прибора «Цитоэксперт». В 70 % случаев проявлялись признаки жизнеспособности материала, проявляющиеся в сохранности клеточной структуры, активном движении под действием электрического поля. В ходе дальнейшего исследования мазков-отпечатков основной группы, кроме вышеописанного цитологического пейзажа, определялись трансплантированные кератиноциты, которые присутствовали как в виде моноклеток, так и клеточных групп. Данные трансплантированные кератиноциты в  $42,0 \pm 0,7$  % случаев проявляли различные выраженные признаки жизнеспособности – сохранность цитоплазматической структуры, хроматофильную способность. Располагались последние в поле аутоплазменного гепаринового преципитата, который микроскопически имел вид неоднородно концентрированной белково-желеобразной субстанции. Трансплантированные клетки дифференцировались до 15–18-го дня, далее аутокератиноциты (до  $77 \pm 1$  %) сливались с эпителиоцитами, регенерирующими из раневых и околораневых тканей. В  $57,0 \pm 0,2$  % случаев на 10–12-й день трансплантированные клетки подвергались изменениям, подобным апоптической деформации – определились ядра клеток, части клеточной мембраны (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Динамика цитограмм в ходе лечения основной и контрольных групп**

Срок лечения, сут.	Контрольная группа	Группа сравнения
От начала лечения до 5-х суток	Липидно-белковые комплексы (детрит), нейтрофилы до 4–6 в поле зрения, микробные тела 1–2 в поле зрения (кокки, палочки), нити фибрина	–
5–11-е	Снижение уровня детрита, уменьшение числа микробных тел до 0–1–0 в поле зрения, снижение нейтрофильной инфильтрации, отсутствие эпителиоцитов, большое количество эритроцитов	Полная ликвидация детрита. Снижение нейтрофильной инфильтрации – 0–1 в поле зрения. Отсутствие микробных тел. Появление лимфоцитов – 1–2 в поле зрения. Появление эпителиоцитов
12–17-е	Сохраняется большое количество эритроцитов – до 10–12 в поле зрения. Эпителиоциты единичные – до 1 на 1–3 поля зрения. Единичные лимфоциты – до 1 на 1–2 поля зрени	Появление макрофагов. Уменьшение лейкоцитов до 1 на 1–2 поля зрения. Эритроциты – до 1 на 2–3 поля зрения. Трансплантированные кератиноциты сохраняют жизнеспособность. Появление эпителиоцитов в центре язвенного дна
18–22-е	Сохраняются эритроциты – 2–3 в поле зрения. Сохраняются единичные нейтрофильные лейкоциты. Появление единичных кератиноцитов – 1 на 1–2 поля зрения. У пациентов с неблагоприятным исходом вновь появляются белково-липидные комплексы. Отсутствие лимфоцитов	Множественные эпителиоциты, макрофаги. Отсутствие эритроцитов, лейкоцитов, микробных тел, элементов детрита
23–28-е	Эритроциты – 4–6 в поле зрения. Вновь появление детрита. Вновь появление нейтрофильных лейкоцитов	Полная эпителизация. В одном случае – исход в кератиноциты, макрофаги. Отсутствие лейкоцитов эритроцитов

Таблица 2

**Цитологический состав мазков-отпечатков у пациентов групп *n1a*, *n1b* и контрольной группы до и после лечения (%)**

Клеточный состав	Группа <i>n1a</i>		<i>p</i>	<i>t</i> *	Группа <i>n1b</i>		<i>p</i>	<i>t</i> *	Контр. группа	
	до лечения	после лечения			до лечения	после лечения			до лечения	после лечения
Эритроциты	81,0±4,5	47,0±5,5	<0,05	2,0	78,0±3,0	39,0±2,5	<0,05	2,0	86,0±3,3	5,0±0,5
Нейтрофилы	19,0±2,3	14,0±2,5	<0,05	2,0	20,0±0,1	17,0±1,0			14,0±2,0	4,0±0,4
Лимфоциты	--	12,0±1,0	<0,05	2,0	2,0±0,1	10,0±2,5	<0,05	2,0	2,0±0,1	17,0±3,0
Моноциты	---	10,0±0,5	<0,05	2,0	----	12,0±1,0	<0,05	2,0	2,0±0,1	20,0±2,0
микробы	++++	+	<0,05	2,0	++++	+	<0,05	2,0	++++	---
Эпителиоциты	----	12,0±1,0	<0,05	2,0		16,0±0,5	<0,05	2,0		36,0±2,0
Макрофаги		5,0±0,2				6,0±0,1				18,0±1,3
детрит	+++++	+	<0,05	2,0	++++	--			++++	---

Примечание: *n1a* – основная подгруппа (37 человек с ТЯ как проявлением СДС); *n1b* – основная подгруппа (28 человек с ТЯВЭ); \**t* – критерий Стьюдента.

## Выводы

1. Предложенный способ лечения трофических язв нижних конечностей позволяет раньше перейти к регенераторному типу цитограмм – на  $9,0 \pm 1,5$  сутки – в основной группе, в группе сравнения подобная картина отмечена к  $17,0 \pm 2,0$  суткам или отсутствовала.

2. Регенераторный тип цитограмм в нашем исследовании характеризуется увеличением моноцитов, макрофагов. Данное наблюдение более выражено у пациентов с СДС в 80 % случаев. Цитологическими признаками регенерации являются: появление и устойчивый рост эпителиоцитов, устойчивое снижение нейтрофилов в обеих подгруппах основной группы.

3. Выраженность грануляционной ткани оценивалась нами по количеству эритроцитов в полях зрения. Исчезновение эритроцитов в препаратах основной группы говорит о сформированном грануляционном вале.

4. Предложенный способ лечения трофических язв нижних конечностей является эффективным и может быть рекомендован к применению в практической медицине.

## Библиографический список

1. *Блескина А. В.* Оптимизация местного лечения гнойных ран на фоне сахарного диабета: дис. ... канд. мед. наук. Красноярск 2011; 19–20.
2. *Васильев А. В., Терских В. В.* Действие эпидермального фактора роста на регенерацию эпидермиса *in vitro*. Доклады академии наук 1994; 334 (5): 660–661.
3. *Дарвин В. В., Лобанов Д. С.* Современные липидно-коллоидные повязки в комплексном лечении трофических язв и длительно незаживающих ран конечностей. Хирург 2013; 2: 34–38.
4. *Корейба К. А.* «Диабетическая стопа». Не разрешенные проблемы. Современные многокомпонентные мази в лечении язвенных дефектов мягких тканей нижних конечностей. Казань 2013; 90.
5. *Кочнев А. С., Измайлов В. Г.* Фибронектин в раневом отделяемом как критерии течения раневого процесса Казанский медицинский журнал 1986; 3: 178–182.
6. *Макаров И. В., Навасардян Н. Н.* Применение концентрата плазменного аутофибронектина в комплексном лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей. Казанский медицинский журнал 2008; 89 (3): 277–280.
7. *Наvasардян Н. Н.* Применение плазменного аутофибронектина в комплексном лечении больных с трофическими язвами нижних конечностей при хронической венозной недостаточности: дис. ... канд. мед. наук. Самара 2008; 153.
8. *Никольский Н. Н.* Биология клетки в культуре / под ред. А. С. Трошина. Л.: Наука 1984; 279.
9. *Спичкина О. С.* Обогащение культуры кератиноцитов человека стволовыми клетками путем селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб. 2008; 21.
10. *Сунцов Ю. И., Дедов И. Н., Шестакова М. В.* Скрининг осложнений сахарного диабета как метод лечебной помощи больным. М. 2008; 63.
11. *Романовский А. В., Васютков В. Я., Садов С. В.* Экономические потери при лечении больных с трофическими язвами нижних конечностей. Материалы второй конференции ассоциации флебологов России. М. 1998; 68.
12. *Шинин В. В.* Морфогенетические процессы в культуре кератиноцитов человека: дис. ... канд. биол. наук. М. 2001; 155.
13. *Brem H.* Healing of elderly patients with diabetic foot ulcers, venous stasis ulcers, and pressure ulcers. Surg. Tech. Internet 2003; XI May: 161–167.
14. *Budgen V.* Evaluating the impact on patients of living with a leg ulcer. Nursing Times. net. 2004; 100 (7): 30–31.
15. *Howard D. P. [et al.]* The role of superficial venous surgery in the management of venous ulcers. Systematic review. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2008; 36 (4): 458–465.

Материал поступил в редакцию 01.08.2014