Опыт применения аутодермопластики и аллогенных фибробластов в лечении различных ран

Шуварин Д.В.
заведующий ожоговым отделением МАУ ГКБ № 40 г.Екатеринбург

Введение

В Российской Федерации ежегодно регистрируются сотни тысяч случаев травматизма, среди которых термическая травма занимает 2-3 место (Кузин М.И. и соавт., 1982; Саркисов Д.С., 1986). Увеличение числа тяжелых термических поражений в 1,5 раза обусловило рост летальности от ожогов в стационарах России с 2,1% в 1990 году до 3,3% в 1997г. (Азолов В.В.,1999). Тяжесть течения ожоговой болезни, осложнения и исход термической травмы в значительной степени зависят от площади глубоких ожогов кожи (Bang R.L., Saif J.K., 1989; Herruzo-Cabrero R. et al., 1991; Aikawa N. et al, 1999) и наличия ингаляционных поражений (Herdon D.N, 1985; Saffle S.R., 1995 и другие).

Активная хирургическая тактика в лечении глубоких ожогов, основные принципы которой были заложены Н.И.Атясовым в 1960 г., получила общее признание. Все еще остаются актуальными вопросы, касающиеся разработки оптимальных алгоритмов оперативного лечения у разных категорий пострадавших. (Баиндурашвили А.Г.,1993, Парамонов Б.А.,2000). Большое значение имеет решение проблемы дефицита донорских ресурсов у больных с критическими и сверхкритическими ожогами кожи. В определенной степени эта задача решается за счет выращивания и трансплантации клеточных культур. С началом применения биотехнологических методов существенно расширились возможности лечения этой категории больных (Шурова Л.И., Будкевич Л.И, 2000). Разработка раневых покрытий, отвечающих современным требованиям, также остается в центре внимания мировых исследований. Способ лечения ожоговых ран на основе применения культивированных клеток включает биологические механизмы, формирующие реакцию репарации (регенерации). Это эпителизация – процесс, при котором клетки многослойного плоского эпителия пролиферируют и перемещаются, закрывая деффекты кожи (с поражением до базальной мембраны) при ожогах I и II степени. Более глубокие раны с повреждением дермы, такие как ожоговые 3А и 4 степени, при которых базальная мембрана оказывается разрушенной, могут также заживать путем эпителизации и хотя это занимает больше времени результат оказывается удовлетворительным. Миграция начинается в базальном слое эпидермиса и в глубоко расположенных фолликулах и потовых железах. В случае повреждения этих структур миграция может осуществляться из окружающего неповрежденного эпидермиса или аутотрансплантанта.

Второй механизм – отложение коллагена – процесс при котором фибробласты перемещаются и продуцируют новый соединительно-тканный

матрикс. Неоангиогенез является фактором стабилизации регенерации и завершения репаративных процессов.

Механизм действия препарата включает два фактора активного воздействии на репарацию. **Во-первых**, это воздействие биологически активных веществ, выделяемых клетками препарата. При использовании в качестве лечебного препарата клетки резко ускоряют механизмы регенерации кожи. Действующим веществом являются биологические вещества пептидной природы, выделяемые пересаженными и опосредованно активизированными, **во-вторых**, собственными клетками. Система биологически активных факторов стимулируют деление и дифференцировку клеток и является основным переносчиком митогенного сигнала клетки. Цитокины обеспечивают взаимную связь и кооперацию клеток. Они играют важную роль в качестве фармакологических агентов, использующихся для активизации репарации. Цитокины контролируют и регулируют образование соединительной ткани, заживление длительно незаживающих ран, приживление кожных трансплантантов и васкуляризацию в очаге.

В настоящее время клиническая эффективность трансплантации культур аллогенных диплоидных фибробластов (АлДФ) в лечении поверхностных ожогов (IIIA ст.) и малых по площади трофических язв венозного происхождения доказана рядом клинических исследований [4-8]. При этом, законченных работ по применению АлДФ в сочетании с аутодермопластикой (АДП) для лечения пациентов с глубокими ожогами (IIIБ – IVст.) и применения этой сочетанной методики для лечения трофических язв сложного генеза пока не существует.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности проблемы, и явилось поводом для проведения настоящего исследования.

Препарат, основанный на использовании культивированных диплоидных клеток человека, предложен ЕНИИВИ.

Целью настоящей работы было обобщение результатов стартового исследования по применению взрослых аллогенных диплоидных фибробластов в сочетании с аутодермопластикой для местного лечения глубоких ожогов и хронических ран сложного генеза.

Задачи работы:

1. Проанализировать медицинскую документацию больных, прошедших лечение на базе ожогового отделения МАУ ГКБ № 40 г.Екатеринбурга в период с марта 2011 г. по февраль 2012 г.
2. Провести сравнительный клинический анализ эффективности применения взрослых аллогенных диплоидных фибробластов в сочетании с аутодермопластикой у пациентов с глубокими ожогами (IIIБ – IVст.).
3. Определить эффективность применения аллогенных фибробластов в дополнение к аутодермопластике при лечении хронических ран сложного происхождения.
4. Выявить возможные негативные последствия применения препарата.
5. Определить экономическую целесообразность применения клеточных препаратов в практике.

Материалы и методы

При апробации и дальнейшей оценке метода использована культура эмбриональных клеток человека, предоставленная Екатеринбургским НИИ вирусных инфекции (далее – АлДФ). Использована клеточная культура ЛЭЧ-4/81 из нормальной ткани легкого эмбриона человека полученная ЕНИИВИ в 1981 году. Препарат зарегистрирован в Российской Федерации.

Препарат АлДФ представляет собой монослой диплоидных клеток, в транспортной среде определенного состава, не содержащий каких-либо контаминирующих агентов, что подтверждается методами ПЦР, вирусологическими и бактериологическими исследованиями. Препарат приготовляется по заказу, в объемах определенных заказчиком. Препарат активен при тяжелых поражениях кожных и слизистых покровов любой этиологии.

Материалом исследования послужили пациенты ожогового отделения МАУ ГКБ № 40, получавших лечение в период с марта 2011г. по февраль 2012 г. Всего пациентов было 359, из них с поверхностными ожогами (I – IIIA ст.) – 225 человек, с глубокими ожогами (IIIБ – IV ст.) – 134 человека. Процент пациентов с глубокими ожогами составил 37,3%. Кроме пациентов с ожогами в отделении за этот период было пролечено 18 больных с хроническими ранами сосудистого и другого происхождения.

Методика применения:

Взвесь клеток переносили на подготовленную рану в концентрации 50-60 тыс.клеток на 1 см.^{2} до, во время или через 2 суток после аутодермопластики расщепленным лоскутом толщиной 0,25 мм. с перфорацией 1/4.

Перевязку производили на 2-е сутки и далее – по мере необходимости.

Материалы исследования:

Из числа пролеченных были сформированы группы пациентов для проведения настоящего исследования: 1 группа (основная) – 6 пациентов с ожогами, у которых в процессе лечения были применены взрослые АлДФ + АДП, и 2 группа (контрольная) – 6 пациентов, получивших обычный ассортимент местных средств лечения +АДП.

В 1 группе пациентов мужчин было 2, женщин – 4, средний возраст составил 50,0 ± 7 лет. У 4 пациентов были ожоги пламенем, у 1 – контактный термический ожог, у 1 – химический ожог. Общая площадь ожогов, в основном, колебалась от 50 до 70, площадь глубоких ожогов составила от 0,3 до 7%. Распределение ожогов по локализации: нижние конечности 26,7%, верхние конечности 20%, ягодицы, лицо и туловище по 13,3 %, промежность и голеностопный сустав по 6,7%.

В 2 группе пациентов было 5 женщин и 1 мужчина, средний возраст составил 46,6 ± 12 лет. У всех пациентов были ожоги пламенем. Общая площадь ожогов колебалась от 30 до 65%, площадь глубоких ожогов составила от 2 до 7%. Таким образом, исследуемые группы были сравнимы по возрасту, общей площади ожогов и площади глубоких ожогов.

Пациентам обеих групп в процессе лечения осуществляли этапные некрэктомии и АДП свободными расщеплёнными кожными лоскутами. В 1 группе в процессе местного лечения были применены АлДФ «Культуры диплоидных клеток человека», переданных в МАУ ГКБ № 40 от ООО «Научно Производственное предприятие «Биотехнология». Абсолютных противопоказаний к использованию применения культур АлДФ не было. Относительными противопоказаниями являлись: общее крайне тяжелое состояние больного, недостаточно подготовленная рана с обсемененностью раны более 100 000 микробных тел на 1 гр. ткани, наличие грибковой флоры.

Причинами применения АлДФ в 1 группе пациентов были – лизис кожных трансплантатов, дефицит аутокожи, необходимость быстрой подготовки к АДП. Количество используемых АлДФ колебалось от 1 млн. до 3 млн. клеток. АлДФ наносились на раны до и во время АДП (n=2), во время, и после АДП (n=1), после АДП (n=3),

У пациентов 2 группы применено традиционное местное лечение + АДП.

АлДФ в количестве от 1 млн. до 3 млн. клеток использованы также для местного лечения 4 пациентов с хроническими ранами: 3 случая – трофические язвы нижних конечностей сосудистого происхождения площадью от 0,7 до 2%, 1 случай – гранулирующая рана передней брюшной стенки площадью 5%. Среди пациентов – 3 женщины и 1 мужчина в возрасте от 62 до 73 лет. Всем пациентам выполнена АДП.

Для оценки эффективности применения АлДФ проводили сравнение планиметрических данных (эпителизация глубоких ожогов и хронических ран в % от поверхности тела) и сроки эпителизации (сравнение количества койко-дней в 1 и 2 группе пациентов). Все данные подвергнуты общепринятой статистической обработке.

Противопоказания:

- Онкологические и онкогематологические больные.
- Тяжелые заболевания нервной системы (эпилепсия, миастения, рассеянный склероз и др.)
- Аутоиммунные заболевания (бронхиальная астма, НЯК, болезнь Крона, аутоиммунный гепатит и др.)

Не являются противопоказаниями следующие состояния*:*

- Больные в терминальной стадии хронических заболеваний.
- Декомпенсированный сахарный диабет.
- Териотоксикоз, надпочечниковая недостаточность.
- Психические заболевания.
- Наличие острой вирусной и бактериальной инфекции, обострение очагов хронической инфекции.
- Осложненное течение ожоговой болезни – декомпенсированное септическое состояние (полиорганная недостаточность более, чем по 5 системам
- Туберкулез, сифилис, ВИЧ инфекция.

Критерии выбытия из исследования

•Острые осложнения (аллергические, пирогенные, токсические реакции) в послеоперационном периоде.

•Отказ пациента.

Согласно представленным критериям пациентов, выбывших из исследования, не было.

Результаты исследования

Результаты исследования обобщены отдельно у пациентов с ожогами и пациентов с хроническими ранами.

У пациентов с ожогами наблюдали следующие положительные результаты. У 2 пациентов с ожогами пламенем на площади 30 – 55% (IIIБ – 6-7%) была проведена аутодермопластика с перфорацией 1:4. При этом, применение АлДФ позволило к 50 суткам добиться практически полного заживления поверхности ожогов (93-98%) и выписать больных с остаточными мозаичными ранами (по 0,1%). У 1 пациента с лизисом трансплантированной аутокожи в промежности на фоне инфицирования после очищения ран проведена повторная АДП с применением АлДФ, на 20 сутки после АДП заживление зарегистрировано на 99% площади глубокого ожога. У 1 пациента с глубокими ожогами кистей (4%) применение АлДФ обеспечило в ранние сроки выполнение АДП со 100% эпителизацией ожогов к 29 суткам. У пациентки с химическим ожогом лица применение АлДФ в области лба после лизиса трансплантата позволило добиться 100% заживления поверхности с образованием тонкого рубца. У 1 пациентки с контактным ожогом в области голеностопного сустава (0,3%) эпителизация зарегистрирована на 18 сутки.

В целом, результаты исследования у пациентов с ожогами в сравнении основной и контрольной групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительные результаты лечения (АДП + АлДФ) пациентов с ожогами

	% эпителизации	% оставшихся ран	средний койко-день
1 группа	97,83	2,17	30,7 ± 11,2
2 группа	98,0	2	45 ± 8,9

Таким образом, сочетание АДП и АлДФ у пациентов с глубокими ожогами привело к достоверному снижению стационарного койко-дня.

Результаты применения АлДФ у пациентов в хроническими ранами не были обработаны статистически в связи с малым количеством наблюдений. Они представлены в таблице 2. Сроки заживления ран оценены в сравнении с теми сроками, в течение которых пациенты лечили хронические раны до поступления в ожоговое отделение МУ ГКБ № 40.

Таблица 2

Результаты лечения (АДП + АлДФ) пациентов с хроническими ранами

пациенты	% эпителизации	средний койко-день	срок догоспитального лечения
1	100	18	6 месяцев
2	100	19	6 месяцев
3	83,3	29	11 месяцев
4	100	23	5 месяцев

Таким образом, у 3 пациентов, имевших трофические язвы, связанные с венозной недостаточностью (2) и диабетической ангиопатией (1), после применения АДП + АлДФ в течение 3 недель произошла полная эпителизация раневой поверхности. При этом, сроки догоспитального лечения пациентов составили от 5 до 6 месяцев. Таким образом, применённая методика практически в 8 раз ускорила процесс заживления «бесперспективных» трофических язв. У одной пациентки, перенесшей многочисленные релапаротомии, связанные с перитонитом, сформировался дефект кожи на передней брюшной стенке 5%. Проведенная АДП не привела к успеху, лоскуты лизировались. Причиной было постоянное применение пациенткой стероидных гормонов по поводу тяжелого ДОА. Выполненная повторная АДП + АлДФ (на площади 3%) позволили эпителизировать 83,3% поверхности дефекта. Оставшиеся мозаичные раны перед выпиской активно эпителизировались за счет краевой и островковой эпителизации.

К несомненным преимуществам метода относится тот факт, что в группе пациентов с обширными ожогами не было летальных исходов. Этот факт мы связываем не только с отсутствием побочных реакций, но и сокращением сроков заживления ран, и, как следствие этого, сокращения потерь с раневым отделяемым, уменьшения угрозы генерализации инфекции.

Кроме того, в ходе проспективного наблюдения (все пациенты находятся в отделении на диспансерном учете) отмечено, что участки, подвергнувшиеся трансплантации препарата, в меньшей степени перерождаются в патологические рубцы.

Негативные последствия использования препарата: В ходе исследований не были выявлены случаи отторжения, анафилактических реакций, пирогенеза и др. негативных реакций, из-за которых было бы прервано лечение.

Выводы

1. Применение биотехнологических методов местного лечения актуально для ожоговых отделений, т.к. удельный вес пациентов с тяжелыми степенями термических повреждений составляет 37,3%.

2. Применение для местного лечения глубоких ожогов аутодермопластики в сочетании с аллогенными диплоидными фибробластами позволяет полноценно эпителизироваться ранам в сложных клинических ситуациях (при дефиците аутокожи, лизисе трансплантатов) и в 1,5 раза сократить пребывание пациентов в стационаре.

3.Использование аутодермопластики в сочетании с аллогенными диплоидными фибробластами при «бесперспективных» хронических ранах сложного генеза способствует их заживлению.

4.Применения препарата не выявило негативных последствий.

5.Сокращение длительности пребывания пациента в стационаре несомненно с экономической точки зрения.

Литература:

1. Смирнов С.В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов / С.В. Смирнов, И.В. Киселев, А.В. Васильев, В.В. Терских // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова – 2003. – №12. – С. 58-62.
2. Николаева Л.Р. Трансплантация стволовых клеток эктодермального происхождения при ожогах роговицы в эксперименте / Л. Р. Николаева // Автореф. дис. канд. мед. наук. – М. – 2006. – С. 199-199.
3. Бурда Ю.Е., Ершов Д.В., Лазаренко В.А. Сравнительный анализ эффективности эмбриональных фибробластов и их супернатанта при пограничных ожогах / Ю.Е. Бурда, Д.В. Ершов, В.А. Лазаренко // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 2 – С. 56-57.
4. Жиркова Е.А. Клинико-экспериментальное обоснование применения аллогенных фибробластов при лечении ожоговых ран IIIА степени / Е. А. Жиркова // Автореф. дис. канд.мед.наук. – НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. – М. – 2011. – С. 92
5. Ледовский С.Н. Сравнительный анализ эффективности применения аллогенных диплоидных фибробластов различной степени зрелости в лечении пограничных ожогов / С. Н. Ледовской // Автореф. дис. канд.мед.наук. – Курск. – 2011. – С. 87.
6. Гриценко В.В. Применение дермальных фибробластов человека в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / В.В. Гриценко, М.И.Блинова, Г.П. Пинаев // Амбулаторная хирургия – 2005. – №3. – С.34-36.
7. Гавриленко А.В. Использование фибробластов и кератиноцитов в комплексном лечении трофических язв. / А.В. Гавриленко, О.В.Павлова, П.Е Вахратьян. // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова – 2008. – №10. – С. 80-83.
8. Мельцова А.Ж. Использование аллогенных фибробластов в комплексном лечении больных трофическими язвами венозной этиологии / А.Ж. Мельцова// Автореф. дис. канд.мед.наук. – Санкт-Петербургский Государственный медицинский Университет имени академика И. П. Павлова. – 2006. – С. 148