ЛЕЧЕНИЕ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТОДИОДНОЙ ФОТОТЕРАПИИ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Аннотация. Представлены клинические данные об инновационном комплексном лечении 15 пациентов (29 язвенных дефектов) с трофическими язвами ног различного генеза – с применением локальных методов антимикробного фотодинамического и фоторегуляторного воздействий на первом этапе с последующей трансплантацией аутогенных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани. Группу сравнения составили 15 пациентов (27 язвенных дефектов), которым проводилось традиционное комплексное лечение. Получены следующие результаты: в контрольные сроки в основной группе закрылись все язвы – 100%, $n=29$, в группе сравнения – 66,8%, $n=18$; медиана сроков достижения полной эпителизации в основной группе – 28 (23; 53,5) сут., это почти вдвое быстрее, чем в группе сравнения, – 73,5 (29,3; 147,5) сут. Показаны безопасность, эффективность, терапевтическая и экономическая целесообразность внедрения в широкую практику подробно описанной методики.

Ключевые слова: трофические язвы ног, локальная светодиодная фототерапия, мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, ауто-ММСК, трансплантация клеток.

Для цитирования: Баранов Е., Буравский А., Третьяк С. Лечение трофических язв с использованием светодиодной фототерапии и стволовых клеток // Наука и инновации. 2019. № 2. С. 70–75. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-2-70-75>

Евгений Баранов,
заместитель заведующего
2-й кафедрой хирургических
болезней БГМУ
по научной работе, кандидат
медицинских наук, доцент;
doc.e.baranov@mail.ru

Александр Буравский,
ассистент 2-й кафедры
хирургических болезней БГМУ,
кандидат медицинских наук;
buravskyav@mail.ru

Станислав Третьяк,
заведующий 2-й кафедрой
хирургических болезней БГМУ,
доктор медицинских наук,
член-корреспондент;
surg2@bsmu.by

Хронические раны представляют собой длительно (более 8 недель) незаживающие раневые поверхности кожных покровов и слизистых оболочек, резистентные к лечебным мероприятиям. Трофические язвы (ТЯ) – крайняя степень их проявления. Причинами их развития могут быть как экзогенные (физические, химические, травматические), так и эндогенные (вазо- и нейротрофические, специфические, остеомиелитические, связанные с патологиями обмена и системными заболеваниями, хронической интоксикацией, обширными некрозами и флегмонами) факторы.

Несмотря на разнообразие этиологии, главная отличительная особенность в патогенезе ТЯ – нарушение трофики кожи [1–3, 6]. Возникновению и последующей хронизации процесса заживления способствуют недостаточные микроциркуляция и количество клеток заживления в ране (при обширных повреждениях), разрушение росткового слоя дермы (при глубоких повреждениях), формирование коагуляционного струпа (ожоги), некроз тканей [3, 5, 9]. Причинами локального «патологического гомеостаза» могут быть разбалансировка взаимодействия главных клеток раны между собой и клетками микроокружения, снижение их митотической и биохимической активности, нарушение ответа на регуляторные сигналы; дисбаланс продукции факторов роста, клеточных и экстрацеллюлярных компонентов и др. [1, 2, 7]. Влияют на ход выздоровления локализация и характер повреждения, общее состояние макроорганизма (слабый иммунный ответ, низкий раневой регенераторный потенциал), а также методы и способы лечения [2, 5, 9]. Микробная контаминация ТЯ, которая в 50% случаев характеризуется полирезистентностью флоры, усугубляет ситуацию [4, 5, 9].

Проблемы лечения длительно незаживающих раневых дефектов кожи и мягких тканей, а также трофических язв ног не теряют актуальности и социально-экономической значимости. Нередко традиционная комплексная методика не обеспечивает быстрого выздоровления либо не гарантирует полного заживления. Один из вариантов терапии – местное использование физических и биологических факторов [2–4, 6, 11].

Цель настоящей работы – оценить эффективность и целесообразность комплексного лечения пациентов с трофическими язвами ног различного генеза, а именно с применением локальных методов комбинированной светодиодной фототерапии и биомедицинских клеточных продуктов – аутогенных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (ауто-ММСК ЖТ)

Предварительные испытания на крысах, которым экспериментально создавали инфицированные раневые дефекты с замедленной регенерацией, а затем лечили их с использованием локального фотовоздействия и последующей трансплантации ММСК, показали хорошие результаты [10].

Клиническое исследование проведено в отделении гнойной хирургии 9-й городской клинической больницы и хирургических отделениях Городской клинической больницы скорой медицинской помощи (Минск) в период с сентября 2010 г. по сентябрь 2016 г. с одобрения комитетов по этике этих лечебных учреждений.

Критерии включения пациентов в исследование: диагноз «хронический трофический раневой дефект ног», возраст от 18 до 75 лет, информированное согласие на проведение лечения с применением новых методик. Критерии исключения: участие в других клинических испытаниях, беременность, онкологическая и психическая патологии, системные заболевания соединительной ткани, ВИЧ, алкогольная либо наркотическая зависимость, фотодерматозы, острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации, туберкулез.

Пациенты были разделены на две группы, по 15 человек в каждой, путем простой открытой рандомизации:

- *контрольная – диагноз «хроническая язва ног»; традиционное комплексное лечение с использованием стандартных принципов местной терапии: современных лекарственных препаратов и раневых покрытий в зависимости от преобладающей стадии раневого процесса и выраженности околульцерозных изменений; частота перевязок определялась индивидуально;*
- *основная – диагноз «трофическая язва ног» различной этиологии; местное лечение с применением комплексной технологии: комбинированная светодиодная фототерапия (антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ) и фоторегуляторная терапия (ФРТ)) и последующая локальная трансплантация ауто-ММСК ЖТ.*

В обеих группах проводилась системная терапия, направленная на улучшение микроциркуляции, реологических свойств крови и тканевого обмена, компенсирование сопутствующей патологии, коррекцию гликемии. По показаниям назначалась антибиотикотерапия (эмпирическая и этиотропная), анальгетики, противовоспалительные средства, при отсутствии противопоказаний – ежедневные сеансы гипербарической оксигенации (от 7 до 10 дней). С целью устранения локальных некротических изменений в ране выполнялись некрэктомия, ультразвуковой дебридмент; для закрытия раневого дефекта проводились различные варианты аутодермопластики; с целью

коррекции факторов, приведших к возникновению и поддерживающих патологическое течение хронических язв, выполнялись различные варианты флeбэктомии, шунтирующие и малоинвазивные операции на артериях и т.д.

Дизайн исследования в основной группе

Выделение биоматериала. Подготовка ММСК ЖТ для трансплантации. Эксплантацию жировой ткани проводили под анестезией (местной и/или внутривенной) путем липэктомии (иссечением) подкожно участка жировой клетчатки объемом 5–7 мл в параумбиликальной области в условиях операционной. После забора фрагментированную ЖТ помещали во флакон с забуференным физиологическим раствором, содержащим антибиотик (цефазолин). В специальном контейнере биоматериал доставляли с учетом международных требований GTP (Good Tissue Practice) в течение не более 2 ч от времени эксплантации в лабораторию молекулярной биологии клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

В лаборатории жировую ткань гомогенизировали в слабо притертом гомогенизаторе и в течение 30–60 мин при 37 °С проводили ферментативную обработку в растворах коллагеназы и диспазы. Полученную клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (100 мкм) и центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. После удаления супернатанта осадок клеток ресуспендировали в полной ростовой среде (DMEM, 10% ЭТС, 2 mM L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин).

Клетки высевали в культуральные флаконы для адгезионных культур (нулевой пассаж). Через 24 ч среду с неадгезированными клетками удаляли и вносили свежую полную ростовую среду. Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, среду меняли через 3–4 суток. При достижении 80% конфлюентности монослоя клетки снимали с пластика трипсинизацией и рассевали в соотношении 1:3 (пассаж 1 и далее).

После накопления клеточной биомассы на 3–4-пассажном уровне ее монослой снимали со дна культурального флакона и переводили в суспензию, смывали со стенок сосуда легким пипетированием, что способствовало образованию гомогенной клеточной взвеси. Выход жизнеспособных клеток оценивали с помощью теста на исключение красителя. Контроль на отсутствие бактерий, грибов и микоплазм проводили с применением микробиологических питательных сред. Чтобы установить принадлежность клеточной популяции к стволовым и прогениторным клеткам, ее гомогенность и выявить процент примеси иных клеточных типов, исследовали фенотипический состав клеточной культуры с использованием моноклональных антител, меченных флюорохромами. Для трансплантации брали ММСК 3–4 пассажей. Количество клеток было различным (от 2×10^6 до 12×10^6) и определялось площадью язвенного дефекта.

Готовые клеточные препараты размещали в стерильных эпиндорфах, маркировали с указанием донора, названия культуры, характеристики (посевная доза), даты изготовления, условий хранения, срока годности и

в специальном контейнере, поддерживающем температуру не менее 25 °С, транспортировали в клиники.

Подготовка раневого ложа к трансплантации ауто-ММСК из ЖТ. Сначала проводили локальную фототерапию дефектов с использованием фототерапевтического комплекса «Календула» (Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, НПК «Люзар» [8]), который обеспечивал монохроматическое светодиодное излучение (с длинами волн $\lambda_1=0,405\pm0,02$ и $\lambda_2=0,630\pm0,03$ мкм) и широкий диапазон плотности энергии облучения. В качестве фотосенсибилизатора (ФС) был выбран препарат для фотодинамической терапии «Фотолон» в форме мази (РУП «Белмедпрепараты»). Процедуры АФДТ и ФРТ выполняли в соответствии с инструкцией по применению метода лечения пациентов с трофическими язвами и гнойно-воспалительными заболеваниями кожи и мягких тканей с применением фототерапевтического светодиодного комплекса (рег. №143–1211, утв. МЗ Республики Беларусь 16.02.2012).

Методика АФДТ. Рану обрабатывали растворами антисептиков и наносили мазь «Фотолон» из расчета 0,3 мл на 1 см². Экспозиция ФС не менее 30 минут. Затем облучали раневой дефект неполяризованным светодиодным излучением (НСИ). Параметры воздействия: длина волны $\lambda_1=0,405\pm0,02$ мкм, плотность энергии облучения (ПЭО) за один сеанс 20 ± 5 Дж/см². На рану накладывали асептическую повязку. Курс лечения – 5 процедур, одна в день.

Методика ФРТ. Обработанную антисептиками раневую поверхность облучали поляризованным светодиодным излучением

(ПСИ). Параметры воздействия: длина волны $\lambda_2=0,630\pm0,03$ мкм, ПЭО за один сеанс 15 ± 5 Дж/см². Рану укрывали асептической повязкой по стандартной методике. Курс лечения 7 процедур, одна в день.

Клиническими критериями готовности ТЯ к введению ауто-ММСК считались отсутствие налета фибрина, гнойного отделяемого, кровотечения, снижение общего микробного числа до уровня менее 10^3 КОЕ/мл, уменьшение воспалительных изменений в ткани, активация репаративных процессов в тканях в зоне язвы (образование грануляций) и по периметру раневого дефекта.

Методика выполнения трансплантации ауто-ММСК.

Во всех случаях суспензию биомедицинского клеточного продукта вводили инъекционно по периферии язвы и в центральную часть раневого ложа. При трофических дефектах менее 10 см², как правило, обкалывание раны по периметру выполняли в 4 точках (3, 6, 9, 12 часов) на расстоянии не менее 1 см от края язвы. Если площадь ТЯ превышала 10 см², инъекции выполняли в 5–7 точках. Это правило распространялось и на количество инъекций в центральную область раневого дефекта (2–4 точки введения). В большинстве случаев процедуру повторяли через 7–10 суток. Трансплантация выполнялась как в фазе пролиферации (грануляционная), так и в фазе ремоделирования (эпителизации).

Об эффективности введения биоматериала при внутрикожной трансплантации свидетельствовало напряжение тканей и перифокальное побледнение кожи в местах инъекций. После клеточной пересадки накладывалась смоделированная по ране прозрачная

Рис. 1. Динамика ОМЧ: основная группа (1) – комплексное лечение с применением локальной светодиодной фототерапии и клеточных технологий; контрольная группа (2) – лечение традиционными методами

асептическая каркасная повязка, которая обеспечивала адекватный влаго- и газообмен раневой поверхности и непроницаемость для бактерий и вирусов, а также позволяла контролировать динамику заживления.

Трансплантацию выполняли на основании и в соответствии с инструкциями по применению: «Метод лечения с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани у пациентов с трофическими язвами» (рег. № 093–0911, утв. МЗ Республики Беларусь от 18.11.2011) и «Метод комплексного лечения пациентов с длительно незаживающими ранами с применением локальной светодиодной фототерапии и аутологичных культивируемых дермальных фибробластов» (рег. № 066–1016 от 17.02.2017).

Сравнительный анализ результатов лечения

На момент включения в исследование у пациентов обеих групп хронические язвы имели признаки воспаления и характеризовались

отечностью и гиперемией периферии язвы, инфильтрацией краев раны, плотных на ощупь и малоподвижных, с фиксацией к подлежащим тканям. В раневом дефекте наблюдались серозно-гнойное или гнойное отделяемое, налет фибрина и участки некроза; полноценные грануляции и краевая эпителизация отсутствовали. Воспалительный процесс сопровождался умеренной или выраженной болью.

У пациентов контрольной группы (КГ) было 27 язвенных дефектов: у 10 чел. – на одной ноге, у 5 – на обеих; одиночные – у 9 пациентов, множественные (от 2 до 3) – у 6. В основной группе (ОГ) – 29 язвенных дефектов, на одной ноге – у 11 чел., на обеих – у 4; одиночные язвы диагностированы у 10 пациентов, множественные (от 2 до 4) – у 5. Различий по возрасту ($p=0,3$), наличию сопутствующих заболеваний ($p=0,7$), а также исходным площадям раневых дефектов ($U=385,5$; $p=0,9$) между ОГ и КГ не выявлено. (Для сравнения независимых выборок применяли U-критерий Манна – Уитни.)

Группа	30-е сутки	60-е сутки	90-е сутки	120-е сутки
Контрольная, n=27	1 (3,7%)	10 (37,0%)	17 (62,9%)	18 (66,6%)
Основная, n=29	5 (17,2%)	24 (82,7%)	28 (96,6%)	29 (100%)

Таблица. Динамика закрытия язвенных дефектов (n) в контрольной (традиционное лечение) и основной (клеточная трансплантация) группах исследования

Сроки существования трофических язв до начала лечения в обеих группах составляли от 6 мес. до 15 лет; средняя продолжительность безуспешного лечения (язва ни разу не закрывалась) – $1,4 \pm 1,1$ года (от 6 мес. до 5 лет).

Возбудители раневой инфекции в ОГ и КГ: *Staphylococcus spp.* – 33,2 и 37,5% соответственно, *Pseudomonas spp.* – 16,7 и 12,5%, *Proteus spp.* – 16,7 и 12,5%;

несколько реже встречались *Streptococcus spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii* и др. Удельный вес полирезистентных штаммов микроорганизмов в раневых биотопах в сравниваемых группах приближался к 50%. Динамика микробного роста, как показало изучение раневого экссудата, имела существенные различия, причем в КГ она во многом

зависела от характера возбудителя и этиотропности эмпирической системной антибиотикотерапии (рис. 1).

Снижение величин ОМЧ до этиологически незначимого уровня ($<10^3$ КОЕ/мл) в КГ на фоне проведения локальной и системной традиционной терапии было отмечено на 10–12-е сутки наблюдения. В ОГ, где на первом этапе применяли локальную АФДТ в течение 5 дней, – уже на 4–5-е сутки независимо от размеров ТЯ. По окончании курса фотодинамического лечения отмечалось некоторое увеличение количества микроорганизмов в раневых биотопах, однако медианные значения ОМЧ не превышали 10^3 КОЕ/мл. Последующее локальное фоторегуляторное воздействие с поляризованным светодиодным излучением ($\lambda_2=0,630$ мкм и ПЭО 10 ± 5 Дж/см²) в течение 7 суток способствовало ускорению завершения первой фазы раневого процесса (как септического, так и асептического периодов воспаления) и переходу в грануляционную стадию, с начальными признаками краевой эпителизации. Во время сеансов ни болевого синдрома, ни каких-либо побочных реакций и осложнений не зафиксировано. В 98% случаев пациенты ОГ отмечали снижение интенсивности боли, вплоть до ее отсутствия, на 5–7-е сутки от старта комбинированного фотолечения.

Сопоставление и анализ полученных данных в процессе лечения и динамического наблюдения на протяжении 45 суток позволили установить статистически достоверные различия в ОГ и КГ по изучаемым параметрам (n – количество язв, $p=0,000$ во всех случаях):

Рис. 2. Трофическая язва пациента С., 36 лет:
А – на момент включения в исследование ($S=7,9$ см²);
Б – перед проведением клеточной трансплантации ($S=5,8$ см²);
В – через 14 суток после трансплантации ($S=2,3$ см²);
Г – 28-е сутки ($S=0,8$ см²)

- снижение значений ОМЧ ниже 10^3 : ОГ – 5-е сутки, $n=17$; КГ – 11-е сутки, $n=24$ ($U=0,5$);
- появление полноценных грануляций: ОГ – 8-е сутки, $n=29$; КГ – 12-е сутки, $n=27$ ($U=39,5$);
- начало краевой эпителизации: ОГ – 8-е сутки, $n=29$; КГ – 14-е сутки, $n=27$ ($U=39,5$);
- уменьшение площади (ΔS) раневых дефектов (% к исходным данным):
 - за 14 суток: ОГ – 17,0%, $n=29$; КГ – 4,0%, $n=27$ ($U=29,0$);
 - за 21 сутки: ОГ – 30,0%, $n=29$; КГ – 7,0%, $n=27$ ($U=39,0$);
 - за 28 суток: ОГ – 70,0%, $n=29$; КГ – 15,0%, $n=27$ ($U=32,0$);
 - за 35 суток: ОГ – 77,8%, $n=28$; КГ – 30,0%, $n=27$ ($U=60,0$);
 - за 45 суток: ОГ – 79,3%, $n=22$; КГ – 50,0%, $n=25$ ($U=97,0$).

Скорость заживления ран на всех этапах исследования в ОГ была выше, чем в КГ ($p<0,05$). Средние сроки достижения полной эпителизации ТЯ представлены в таблице.

Сроки окончательного закрытия дефектов кожи зависели как от размеров и глубины ТЯ, времени существования раневого дефекта, периульцерозных изменений в тканях, сопутствующей патологии, так и от возраста пациента. В возрастной группе моложе 60 лет в раннем послетрансплантационном периоде площадь раневого дефекта в ОГ уменьшилась на $35,7\pm 5,1\%$ по отношению к исходным данным, в позднем – на $94,7\pm 7,2$ (рис. 2); в КГ – на $10,2\pm 7,2\%$ в начале лечения и $40,2\pm 15,2\%$ – в конце. У пациентов в возрасте 60 лет и старше аналогичные показатели составили: в ОГ – $21,4\pm 8,0$ и $61,4\pm 23,8\%$ соответственно, в КГ – $7,6\pm 4,0$ и $24,3\pm 11,0\%$.

Отдаленные результаты лечения: в контрольные сроки

закрылись все раны (100%) в ОГ и 18 ран (66,8%) в КГ; медиана сроков полной эпителизации язв в ОГ – 28 (23; 53,5) суток, КГ – 73,5 (29,3; 147,5) суток ($p < 0,05$). Рецидив язвы: КГ – 5 (26,3%) случаев, ОГ – 1 (3,4%). Следует отметить, что клеточная аутотрансплантация нивелирует риски, связанные с возможным отторжением трансплантата и переносом инфекций от донора к реципиенту.

Таким образом, комплексное применение комбинированных методов локальной фототерапии и культивированных ауто-ММСК жировой ткани является безопасным и эффективным способом

ускоренного лечения длительно незаживающих трофических язв, способствует полному закрытию ран и восстановлению кожных покровов; может использоваться и как самостоятельная процедура для повышения динамики процессов регенерации, и в сочетании с операциями, направленными на коррекцию этиопатогенетических факторов. Локальная антимикробная фотодинамическая терапия с применением неполяризованного светодиодного излучения и клеточная аутотрансплантация исключают развитие системных побочных реакций и осложнений. ■

■ **Summary.** The article presents clinical data of the complex treatment of 15 patients (29 ulcerative defects) with trophic ulcers of the legs of various origins using local methods of combined Light-emitting diode (LED) phototherapy and biomedical cell products. The comparison group consisted of 15 patients (27 ulcerative defects) who underwent traditional complex treatment using standard principles of local therapy. The following results were obtained: in the control periods, ulcers (29) were closed in all patients (100%) of the main group, and 18 ulcers (66.8%) in the comparison group. The median timing of complete epithelialization of ulcers in the main group was 3 times less – 28 (23; 53.5) days – than in the comparison group patients – 73.5 (29.3; 147.5) days. It is shown that the use of an integrated approach in treating patients with trophic leg ulcers using local methods of antimicrobial photodynamic and photoregulatory effects in the first stage of treatment with subsequent transplantation of autologous multipotent mesenchymal stem cells of adipose tissue is a safe and effective method that contributes to a more rapid and complete closure of wounds restoration of the skin.

■ **Keywords:** trophic ulcers of the legs, local LED phototherapy, mesenchymal stem cells of adipose tissue, MCS, cell transplantation.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-2-70-75>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абаев Ю. К. Расстройство заживления ран и методы их коррекции / Ю. К. Абаев // Вестник хирургии. 2005. Т. 164, № 1. С. 111–113.
2. Бабаева А. Г. Регенерация – факты и перспективы / А. Г. Бабаева. – М., 2009.
3. Биология стволовых клеток и клеточные технологии: в 2 т. / под ред. М. А. Пальцева. Т. 1. – М., 2009.
4. Буравский А. В. Целесообразность использования комбинированной локальной светодиодной фототерапии в лечении пациентов с раневыми дефектами наружной локализации / А. В. Буравский, Е. В. Баранов, С. И. Третьяк // Медицинский журнал. 2016. № 1. С. 86–92.
5. Длительно незаживающие раны и язвы (патогенез, клиника, лечение) / П. И. Толстых [и др.]. – М., 2009.
6. Зорин В. Л. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи / В. Л. Зорин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009. Т. IV, № 4. С. 26–40.
7. Клеточные технологии для регенеративной медицины: сб. науч. ст. / под ред. Г. П. Пинаева, М. С. Богдановой, А. М. Кольцовой. – СПб., 2011.
8. Комплекс фототерапевтический «Календула»: Руководство по эксплуатации. ТУ ВУ10032654.010–20РЗ / Ин-т физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси.
9. Современные подходы к лечению венозных трофических язв / И. Г. Учкин, А. Г. Багдасарян // Русский медицинский журнал. 2013. Т. 21, № 15. С. 810–814.
10. Экспериментальное обоснование эффективности применения методов светодиодного фототерапевтического воздействия и клеточных технологий при лечении инфицированных раневых дефектов с замедленной регенерацией / Е. В. Баранов, А. В. Буравский, З. Б. Квачева, И. Б. Василевич, А. В. Мостовников, С. И. Третьяк, И. Д. Волоотовский // Медицина. 2017. № 2. С. 47–57.
11. Chen H.-Ch. Investigation of irradiance efficiency for LED phototherapy with different arrays / H.-Ch. Chen, G.-Y. Wu // Optics Communications. 2010. Vol. 283. P. 4882–4886. // <http://www.elsevier.com/locate/optcom>.

Статья поступила в редакцию 17.09.2018 г.