

## Характеристика морфологических изменений мышечной ткани голени после PRP-терапии

Никоненко А.С., Волошин А.Н., Макарченко Ю.И.

*Запорожский государственный медицинский университет (Запорожье)*

Количество людей, страдающих хронической ишемией нижних конечностей, с каждым годом растет. Одним из перспективных направлений в лечении пациентов с этой патологией является клеточная терапия для стимуляции ангиогенеза. В ходе исследования всем больным проводили процедуру Platelet Rich Plasma (PRP), используя систему центрифугирования “Harvest Technologies, SmartPReP 2”, США. Применение PRP-терапии у пациентов с окклюзией бедренно-подколенно-берцового сегмента артериального русла приводит к увеличению числа капилляров на одно мышечное волокно на 58,6% и увеличению размера мышечных волокон на 61,1%. PRP-терапия – эффективный и безопасный метод лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК).

**Ключевые слова:** клеточная терапия, бедренно-подколенно-берцовые окклюзии.

По данным международных исследований, хроническую ишемию нижних конечностей (ХИНК) регистрируют в 5–8% случаев у лиц старше 50 лет, а при наличии факторов риска (курение, сахарный диабет, гиперлипидемия, артериальная гипертензия) – примерно у 30% [1, 2, 3]. Несмотря на большой арсенал хирургических и эндоваскулярных вмешательств, примерно у 20–40% пациентов с ХИНК «прямые» методы реваскуляризации не могут быть применены вследствие анатомических особенностей поражения магистральных артерий, длительности заболевания и сопутствующей патологии [5, 6]. Число «больших» ампутаций нижних конечностей в связи с прогрессирующей ХИНК в Евросоюзе и США превышает 100 тыс. в год [4, 5]. Одним из перспективных направлений является лечение пациентов обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмой, в которой содержится большое количество факторов роста и биологически активных белков [7, 8, 9]. Особенности применения PRP-терапии в сосудистой хирургии остаются недостаточно изученными и требуют дальнейшего совершенствования.

**Цель исследования** – изучить морфологические изменения мышечной ткани голени у больных с «неоперабельными» типами окклюзий бедренно-подколенно-берцового сегмента артериального русла после PRP-терапии.

**Материалы и методы.** В ходе исследования проведен анализ комплексного лечения 19 пациентов с «неоперабельными» типами окклюзий бедренно-подколенно-берцового сегмента. Средний возраст больных составил  $65 \pm 4,9$  года. В зависимости от степени хронической ишемии нижних конечностей (по классификации Фонтейна-Покровского) больные распределены следующим образом: IIБ ст. ишемии верифицирована у 5 больных, III ст. ишемии – у 6 и IV ст. – у 8 больных.

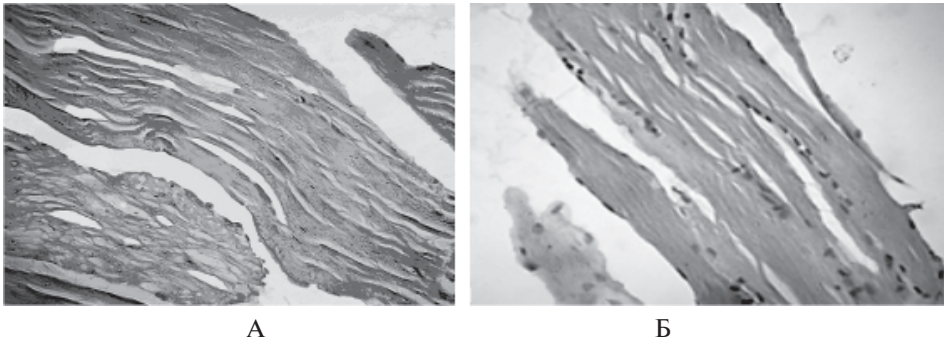
Процедуру PRP-терапии проводили, используя систему центрифугирования “Harvest Technologies, SmartPReP 2”, США. Применяли набор APC+60 для получения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами и факторами роста (Autologous Platelet Concentrate+). Полученный PRP-концентрат вводили путем 20 внутримышечных инъекций по ходу окклюзированных артерий в ишемизированные мышцы голени и в зоны трофических изменений. Со 2-го дня лечения все больные выполняли разработанный

комплекс физических упражнений, направленный на укрепление мышц голени и бедра. Стимуляция ангиогенеза у всех больных расценивалась как единственно возможный метод улучшения кровообращения в пораженной конечности. Для определения эффективности PRP-терапии как стимулятора процесса ангиогенеза были проведены гистологические исследования полученных биоптатов мышечной ткани голени больных. Для гистологического исследования осуществляли забор мышц ишемизированной голени пункционной иглой «Spring Cut № 16». Пункцию проводили перед первой процедурой PRP-терапии и через 6 мес. при повторной процедуре. Биоптаты фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в парафин. Серийные парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. В срезах при обзорной микроскопии изучали состояние мышечных волокон, наличие в них ядер, исчерченность саркоплазмы и особенности распределения соединительной ткани. При помощи окуляр-микрометра на поперечных срезах мышечных волокон измеряли их диаметр в микрометрах (мкм) и подсчитывали количество капилляров, которые кровоснабжают мышечные волокна. Полученные результаты представляли в виде средней (М) и стандартной ошибки среднего (m). Статистически достоверными считали различия между показателями при отклонении нулевой гипотезы и уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенного комплексного лечения у 17 больных удалось сохранить нижнюю конечность. В ходе всего периода динамического наблюдения не было зафиксировано ни одного случая анафилактической реакции, некротических дефектов или гнойно-воспалительных реакций в местах введения PRP-концентрата. У 4 пациентов с исходной 3 ст. ХИНК через 6 месяца после лечения достигнута элиминация болевого синдрома и увеличилась дистанция безболевого ходьбы до 200 м. У пяти пациентов с IV ст. ишемии также были отмечены положительные результаты лечения. Трофические изменения уменьшились, частично зажили, болевой порог снизился до отметки 0.

В биоптатах, забранных из трехглавой мышцы голени у пациентов с ХИНК перед проведением PRP-терапии, выявлены ишемические изменения скелетной мускулатуры. Большинство мышечных волокон были незначительного диаметра ( $39,3 \pm 1,4$  мкм), с гиперхромными, вытянутой формы и расположенными по периферии мышечных волокон ядрами. В большинстве из них ядрышки не обнаруживались. В части мышечных клеток отсутствовала исчерченность саркоплазмы. В препаратах встречалось незначительное количество одиночных гипертрофированных мышечных волокон диаметром более 80 мкм. Соединительная ткань эндомизия разрыхлена. Артериолы были спазмированы, с суженным просветом и утолщенными стенками (рис. 1А). Практически у всех больных в биоптатах, полученных из трехглавой мышцы голени, выявлено увеличение количества соединительной ткани, а также спавшихся без просвета капилляров. Большинство капилляров без просвета. Количество капилляров на одно мышечное волокно составляет  $3,58 \pm 0,15$ .

Через шесть месяцев после проведенной PRP-терапии и регулярных физических упражнений все пациенты отмечали улучшение качества жизни. С согласия пациентов была проведена повторная биопсия скелетной ткани трехглавой мышцы голени во время проведения повторного сеанса PRP-терапии. Гистологическое изучение биоптатов показало значительное улучшение морфологической картины состояния ткани трехглавой мышцы голени (рис. 1Б). В препаратах симпластов всех пациентов выявляется резкое увеличение поперечных размеров мышечных волокон. Преимущественно они имеют диаметр  $63,3 \pm 1,4$  мкм ( $p < 0,05$ ). В них увеличивается количество ядер (рис. 1Б). Саркоплазма мы-



**Рис. 1.** Состояние скелетной мускулатуры до (А) и после (Б) проведенной PRP-терапии больного 67 лет. С ХИНК 4 ст. ШИК-реакция с прокрашиванием ядер гематоксилином. Об.40; ок 10.

шечных клеток окрашивается более интенсивно при постановке ШИК-реакции. На продольных срезах мышечных волокон четко визуализируется поперечная исчерченность саркоплазмы. Отчетливо проявляются капилляры, просветы которых преимущественно раскрыты. Число капилляров на одно мышечное волокно статистически достоверно увеличивается до  $5,6 \pm 0,2$ . В препаратах всех пациентов выявляется резкое увеличение количества гипертрофированных мышечных волокон. Преимущественно они имеют диаметр больше 80 мкм. В соединительной ткани обнаруживаются лимфоциты. При этом не отмечено увеличение соединительной ткани эндомизия. Таким образом, через шесть месяцев после проведения PRP-терапии в препаратах биоптатов у всех пациентов достоверно увеличивается число капилляров на одно мышечное волокно, что является основой улучшения кровоснабжения мышечной ткани, в которой наблюдаются явления гипертрофии мышечных волокон.

### **Выводы**

1. Применение PRP-терапии у пациентов с окклюзией бедренно-подколенно-берцового сегмента приводит к увеличению числа капилляров на одно мышечное волокно.
2. Через шесть месяцев после PRP-терапии при регулярных физических нагрузках поперечный размер мышечных волокон трехглавой мышцы голени увеличивается на 61,1%.
3. PRP-терапия – эффективный и безопасный метод лечения пациентов с окклюзией бедренно-подколенно-берцового сегмента.

### **Литература**

1. Hirsch A. T. The global pandemic of peripheral artery disease // The Lancet. – 19 October 2013. – Vol. 382. – Issue 9901. – P. 1312–1314.
2. Самодай, В. Г. Нестандартная хирургия критической ишемии нижних конечностей / В. Г. Самодай, Ю. А. Пархисенко, А. А. Иванов. – М. : МИА, 2009. – 240 с.
3. Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения: руководство для врачей / Ткачук Всеволод Арсеньевич. – М. : Литтерра, 2009. – 44 с.

4. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia // *Circulation*. – 1991. – Vol. 84 (4). – P. 16–26.
5. Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 103. – P. 696–709.
6. Norgren L., Hiatt W.R., et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II) // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2007. – Vol. 33. – S1eS75.
7. D. J. Collinson and R. Donnelly Therapeutic Angiogenesis in Peripheral Arterial Disease: Can Biotechnology Produce an Effective Collateral Circulation // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2004. – Vol. 28. – P. 9–23.
8. Foster T. E., Puskas B. L. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* – 2009 Nov. – Vol. 37 (11). – P. 2259–72.
9. Iba O., et al. Angiogenesis is by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs // *Circ.* – 2002. – Vol. 106. – P. 2019–2025.

### **Характеристика морфологічних змін м'язової тканини гомілки після PRP-терапії**

**Никоненко О.С., Волошин О.М., Макарченко Ю.І.**

Кількість людей, що страждають на хронічну ішемію нижніх кінцівок (ХІНК), з кожним роком зростає. Одним з перспективних напрямів у лікуванні пацієнтів цієї групи є клітинна терапія для стимуляції ангиогенезу. В ході дослідження всім хворим проводили процедуру PRP-терапії, використовуючи систему центрифугування “Harvest Technologies, SmartPReP 2”, США. Застосування PRP-терапії у пацієнтів з оклюзією стегново-підколінно-гомількового сегмента призводить до зростання числа капілярів на 58,6% на одне м'язове волокно та збільшення розміру м'язових волокон на 61,1%. PRP-терапія – ефективний і безпечний метод лікування пацієнтів із ХІНК.

**Ключові слова:** *клітинна терапія, стегново-підколінно-гомількові оклюзії.*

### **Characteristics of Leg Muscle Tissue Morphological Changes after PRP-Therapy**

**Nikonenko A.S., Voloshyn A.N., Makarchenko Y.I.**

The number of people suffering from chronic lower limb ischemia is growing every year. One of the promising treatment directions of this patients is a cell therapy to stimulate angiogenesis. In the study, PRP therapy procedure was carried out using a system of centrifugation “Harvest Technologies, Smart PReP 2”, USA. As a result, the 6-month follow-up after PRP-therapy in patients with femoral-popliteal-tibial occlusion is an increase by 58.6% capillaries per muscle fiber and increase the size of the muscle fibers by 61.1%. PRP - therapy is effective and safe method of treating patients with CLI.

**Key words:** *cell therapy, femoral-popliteal-tibial occlusion.*