

## Дослідження гемомікроциркуляторного русла при хронічній критичній ішемії нижньої кінцівки у хворих на цукровий діабет

С.М. Діденко

*Клінічна лікарня «ФЕОФАНІЯ» Державного управління справами, Київ*

### Реферат

**Вступ.** Протягом останніх десятиліть захворюваність на цукровий діабет ЦД прийняла масштаби неінфекційної пандемії. Поширеність ЦД кожні 10–15 років подвоюється. Більше ніж у половини хворих виникає діабетична мікроангіопатія. Це ускладнення ЦД пов'язують з високим ризиком розвитку і швидкого прогресування судинної патології.

**Мета дослідження.** Проаналізувати результати дослідження гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) при хронічній критичній ішемії нижньої кінцівки (ХКІНК) у хворих на цукровий діабет (ЦД). Розробити методику розрахунку показника ступеня діабетичної мікроангіопатії (ПСДМ) на підставі визначення кількісних характеристик ураження ГМЦР шкіри у хворих на ЦД із ХКІНК.

**Матеріали та методи.** Були відібрані зразки парафінових блоків шкіри 63 хворих (дослідна група) на ЦД, тип II з ХКІНК на тлі поєднаного стенозуючо-оклюзійного ураження артерій стегнового та підколінно-гомільного сегментів в поєднанні з виразково-некротичним ураженням стопи, які проходили лікування в Центрі судинної хірургії Клінічної лікарні «ФЕОФАНІЯ» Державного управління справами протягом 2013–2017 рр. Групою порівняння були вибрані зразки шкіри та м'язів 30 пацієнтів, що не мали системних захворювань.

Проводили гістологічні та імуногістохімічні дослідження для виявлення колагену IV – маркера базальних мембран, VEGF – васкулярного ендотеліального росткового фактора; CD 31 – ендотеліального фактора; гладком'язового актину. Вимірювали та порівнювали діаметр кровеносних судин ГМЦР шкіри та м'язів, щільність капілярів на одиницю площі. На підставі отриманих даних проводили розрахунок ПСДМ.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Були виявлені характерні зміни морфометричних показників судин ГМЦР шкіри у хворих на ЦД, тип II з хронічною критичною ішемією нижньої кінцівки. Розроблена методика розрахунку ПСДМ. Виявлена кореляція між ступенем діабетичної мікроангіопатії ймовірністю тромбозу після гібридної артеріальної реконструкції та розроблений алгоритм обстеження хворих в післяопераційному періоді.

**Висновки.** 1. Сукупність отриманих даних про якісні та кількісні зміни ГМЦР шкіри дозволила розробити критерії для розрахунку ПСДМ.

2. Виявлена кореляція між ступенем діабетичної мікроангіопатії та ймовірністю тромбозу після гібридної артеріальної реконструкції.

3. Визначення ступеня тяжкості діабетичної мікроангіопатії може бути використане при створенні алгоритму обстеження для встановлення показань до превентивних операцій, що попереджують тромбоз зони артеріальної реконструкції (ЗАР) та характеру консервативного лікування після артеріальних реконструкцій у хворих на ЦД із ХКІНК.

**Ключові слова:** цукровий діабет, синдром діабетичної стопи, діабетична мікроангіопатія, гемомікроциркуляторне русло, ішемія, гібридна артеріальна реконструкція.

### Defeat of the hemomycirculatory bed in patients with diabetes mellitus with critical ischemia of the lower limb

Didenko S.N.

*Clinical Hospital «Feofaniya» of State Directorate for Affairs, Kyiv*

### Abstract

**The aim of the study.** To develop the method of calculation of the index of degree of diabetic microangiopathy on the basis of determining the quantitative characteristics of damage to the hemomycirculatory skin of the skin in patients with diabetes mellitus with critical ischemia of the lower limb.

**Material and methods.** Samples of paraffin blocks of skin of 63 patients (experimental group) on diabetes mellitus, type II with chronic critical ischemia of the lower limb, on the background of combined stenotic-occlusive lesions of the arteries of the femoral and pediculophagomic segments, in combination with ulcerative-necrotic footlesions, who were treated at the Center for Vascular Surgery at the Clinical Hospital "FEOPHANIA" of the State Department of Affairs during 2013 – 2017 were selected. A comparison group selected samples of skin and muscles of 30 patients who did not have systemic diseases.

Histologic and immunohistochemical studies were conducted to detect collagen IV – marker of basal membranes, VEGF – vascular endothelial growth factor; CD 31 - endothelial factor; smooth muscle actin. Measured and compared the diameter of the blood vessels of the hemomycirculatory channel of skin of and muscle and the density of the capillaries. On the basis of the obtained data, the calculation of the degree of diabetic microangiopathy was performed.

**Results of the studies and their discussion.** Characteristic changes were observed in the morphometric indices of blood vessels in the hemomycirculatory channel of the skin in patients with diabetes mellitus, type II with chronic critical ischemia of the lower limb. The method of calculating the degree of diabetic microangiopathy is developed. The correlation between the degree of diabetic microangiopathy and the probability of thrombosis after hybrid arterial reconstruction is revealed, and the algorithm of patient examination in the postoperative period is developed.

**Conclusions.** 1. The collection of data on qualitative and quantitative changes in the hemomycirculatory channel of the skin allowed to develop criteria for the calculation of the degree of diabetic microangiopathy.

2. The rewas a correlation between the severity of diabetic microangiopathy and the probability of thrombosis after hybrid arterial reconstruction.

3. Determination of severity of diabetic microangiopathy can be used in the creation of a survey algorithm to identify indications for preventive operations that prevent thrombosis of the arterial reconstruction area and the nature of conservative treatment after arterial reconstruction in patients with diabetes with chronic critical ischemia of the lower limb.

**Key words:** diabetes mellitus, diabetic foot syndrome, diabetic microangiopathy, hemomyocirculatory channel, ischemia, hybrid arterial reconstruction.

**Вступ.** Протягом останніх десятиліть захворюваність на цукровий діабет ЦД прийняла масштаби неінфекційної пандемії. Поширеність ЦД кожні 10–15 років подвоюється. Більше ніж у половини хворих виникає діабетична мікромакроангіопатія [1]. Це ускладнення ЦД пов'язують з високим ризиком розвитку і швидкого прогресування судинної патології [2].

Особливо складних тактичних і технічних рішень потребує група хворих на ішемічну форму синдрому діабетичної стопи з поєднанням оклюзії поверхневої стегнової артерії (ПСА) та стенозично-оклюзійного ураження (СОУ) артерій підколінно-гомільково-стопового сегменту, застосування до яких стандартних методів артеріальних реконструкцій не завжди ефективно [3].

Безперечною є патогенетична роль морфологічних змін ГМЦР у розвитку такого ускладнення ЦД, як синдром діабетичної стопи. Не викликає сумнівів здатність таких судинних порушень призводити до незворотних змін тканин стопи [4].

Важливим фактором, що має велике значення для регенерації тканин, є рівень їх васкуляризації. Сучасні імуногістохімічні методи дозволяють з високою достовірністю виявляти широкий спектр клітинних типів і позаклітинних компонентів. Знання імуногістохімічних особливостей різних компонентів тканин є необхідною умовою для використання цих методів для діагностики ряду захворювань [5].

**Мета дослідження.** Проаналізувати результати дослідження гемомікроциркуляторного русла при хронічній критичній ішемії нижньої кінцівки у хворих на цукровий діабет. Розробити методику розрахунку показника ступеня діабетичної мікроангіопатії на підставі визначення кількісних характеристик ураження гемомікроциркуляторного русла шкіри у хворих на цукровий діабет із хронічною критичною ішемією нижньої кінцівки.

**Матеріали та методи.** Для імуногістохімічного та гістологічного дослідження із 178 парафінових блоків шкіри, підшкірної клітковини і м'язів 63 пацієнтів було виготовлено та досліджено 487 мікропрепаратів. Усі пацієнти хворіли на ЦД тип II з ХКІНК на тлі поєданого СОУ артерій стегнового та підколінно-гомількового сегментів в поєднанні з виразково-некротичним ураженням стопи. Всі пацієнти проходили лікування в Центрі судинної хірургії Клінічної лікарні «ФЕОФАНІЯ» Державного управління справами протягом 2013–2017 рр. Чоловіків було 38 (60,3%), жінок – 25

(39,7%), у віці від 59 до 84 років. Середній вік становив  $67,3 \pm 5,2$  року.

До групи порівняння були відібрані зразки шкіри та м'язів 30 пацієнтів, що не мали системних захворювань.

Матеріал отримували у хворих дослідної групи під час проведення гібридних артеріальних реконструкцій з метою відновлення артеріального кровообігу в нижній кінцівці, які полягали у відкритому хірургічному втручанні на ПСА у вигляді шунтування або ендартеректомії і ендоваскулярному втручанні на артеріях підколінно-гомількового сегменту та у хворих групи порівняння під час загально-хірургічних і ортопедичних операцій з дотриманням правил етики і деонтології без морально-правових порушень згідно з положенням Конвенції Ради Європи «Про захист прав та гідності людини в аспекті біомедицини» (1997).

Отриманий матеріал фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну. Після фіксації відібрані ділянки тканин ущільнювали у парафіні за загально прийнятою схемою. Парафінові зрізи товщиною 5 мкм були виготовлені за допомогою мікротому Leica 2025. Частину з них забарвлювали гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізеном. Для оцінки стану базальних мембран та порушень обміну в тканинах використовували метод Шифф-йодна кислота (ШИК) за Мак Манусом з контролем амілазою. Проводились імуногістохімічні дослідження з використанням антигенів:

VEGF – васкулярноендотеліальний ростковий фактор;

CD 31 – ендотеліальний фактор (маркер ендотеліальних клітин);

Actin (SMA) – маркер доброякісного судинного процесу, також виявляє клітини з частковим гладком'язовим диференціюванням;

Collagen IV – маркер судинного процесу, виявляється в базальних мембранах.

Імуногістохімічні реакції проводили за стандартними протоколами з використанням моноклональних мишачих та кролячих антитіл.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У хворих дослідної групи спостерігали потовщення базальної мембрани при збільшенні експресії колагену IV типу, що призводило до прогресуючого звуження судин ГМЦР різного ступеня. Крім того, виявлялося також розпушення базальної мембрани стінки судин ГМЦР сосочкового шару шкіри (рис. 1), що порушувало їх проникність.

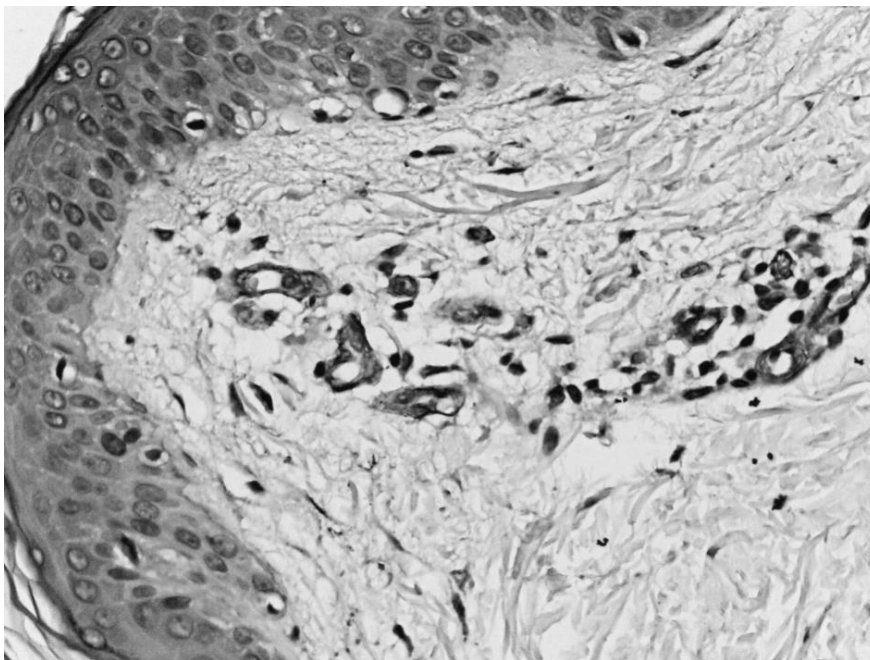


Рис. 1. Розпушення та потовщення базальної мембрани судин ГМЦР сосочкового шару шкіри. Забарвлення антитілами до колагену IV типу. Збільшення 400.

При вивченні щільності та розподілу судин ГМЦР шкіри після імуногістохімічного забарвлення антитілами до CD31 у пацієнтів групи порівняння виявлялась рівномірна експресія антигену в ендотелії судин, що свідчило про

нормальний фізіологічний стан. Проте після забарвлення препаратів шкіри та м'язів хворих на ЦД було виявлено, що експресія CD31 мала високу інтенсивність та вогнищевий характер (рис. 2).

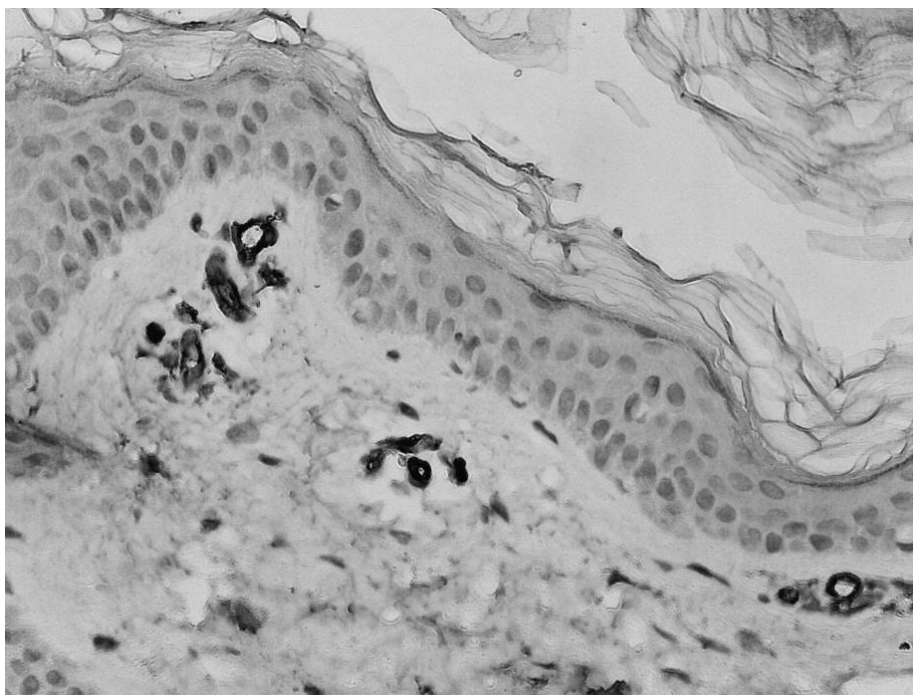


Рис. 2. Шкіра хворого на цукровий діабет. Вогнищева експресія в судинах дерми. Імуногістохімічне забарвлення антитілами до CD 31. Збільшення 400.

Підрахунок кількості капілярів сосочкового шару дерми показав, що у хворих з 1 ступенем діабетичної мікроангіопатії (ДМАП) їх щільність

на 1 мм<sup>2</sup> була найменша та поступово збільшувалась, максимально зростаючи при 3 ступені ДМАП (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни параметрів судин ГМЦР сосочкового шару дерми

Кровоносні судини	Діаметр просвіту судин у пацієнтів групи порівняння (мкм)	Діаметр просвіту судин шкіри у пацієнтів хворих на ЦД з ДМАП (мкм)		
		1 ступінь	2 ступінь	3 ступінь
Артеріоли	26,63±1,69	24,02±2,7*	15,65±1,44*	10,28±0,95*
Венули	38,98±2,15	33,26±3,07	20,18±2,03*	12,64±1,06*
Капіляри	8,19±0,69	7,58±1,1*	6,38±0,58*	5,73±0,47*
Щільність капілярів на 1 мм <sup>2</sup>	98,5±3,4	112,1±5,6	138,3±4,1*	156,9±8,1*

Примітки: \* p&lt;0,05 – достовірність показників порівнянн з показниками групи пацієнтів, котрі не мали ЦД.

У шкірі хворих на ЦД змінювались процеси ангиогенезу. Новоутворення кровоносних судин при ЦД посилювалось при підвищенні експресії рецепторів VEGFR-1 в шкірі хворих з ДМАП, корелюючи з вираженістю порушень в ГМЦР. Так, в судинах шкіри пацієнтів групи порівняння спостерігали слабо виражену імунопозитивну реакцію, а в судинах при 2 та 3 ступені ДМАП посилювався синтез ендотеліального судинного факто-

ра росту і реакція кровоносних судин була яскраво виражена.

Зважаючи на відносну простоту біопсії шкіри, виявляється перспективним її використання для визначення показника ступеня ДМАП.

Базуючись на результатах дослідження ми розробили методику визначення показника ступеня діабетичної мікроангіопатії (ПСДМ). Приклад розрахунку ПСДМ наведений у таблиці 2.

Таблиця 2

Приклад розрахунку ПСДМ

Кровоносні судини	Нарахування балів залежно від діаметра просвіту (мкм) та кількості на 1 мм <sup>2</sup> судин ГМЦР шкіри у пацієнтів, хворих з ДМАП			
	0 балів	1 бал	2 бали	3 бали
Артеріоли	≥26	25-18	17-12	≤11
Венули	≥39	38-25	24-14	≤14
Капіляри	≥8,2	8,2-6,5	6,4-5,5	≤5,4
Кількість капілярів на 1 мм <sup>2</sup>	≤98	99-128	129-157	≥157

Приклад розрахунку ПСДМ: середній діаметр артеріоли 15,28 мкм – 2 бали, середній діаметр венули 27,32 мкм – 1 бал, середній діаметр капіляра 4,96 мкм – 3 бали, середня кількість капілярів на 1 мм<sup>2</sup> = 162,45 – 3 бали. Сума балів 1+2+3+3=9. ПСДМ = 9/4 = 2,25.

Очевидно, що ПСДМ може коливатися в межах від «0» до «3». Відповідно, за «легкий ступінь» ДМАП вважали стан ГМЦР, якому був притаманний показник ПСДМ в межах 0–1, при ПСДМ в межах 1–2 вважали ДМАП «середнього ступеня важкості», при ПСДМ в межах 2–3 вважали ДМАП «важкою».

Із 63 хворих, препарати шкіри та м'язів яких були досліджені, у 8 (12,7%) хворих – ПСДМ коливався у межах 0-1, що свідчило про легкий ступінь ДМАП, у 11 (17,5%) хворих – ПСДМ коливався у межах 1–2, що свідчило про середній ступінь тяжкості ДМАП, у 44 (69,8%) – ПСДМ коливався у межах 2–3, що свідчило про тяжкий ступінь ДМАП. Усі хворі після проведеної гібридної артеріальної реконструкції протягом періоду спостереження отримували антитромбоцитарну терапію препаратом Клопідогрель 75 мг peros 1 раз на добу. Із 8

хворих з легким ступенем ДМАП протягом періоду спостереження тромбозів зони артеріальної реконструкції не було. З 11 хворих із середнім ступенем важкості ДМАП протягом періоду спостереження тромбоз зони артеріальної реконструкції зафіксовано у 1 (9,1%) пацієнта. Із 44 хворих із важким ступенем ДМАП протягом періоду спостереження тромбоз зони артеріальної реконструкції зафіксовано у 12 (27,3%). Це може свідчити про важливу роль ДМАП у створенні периферичного судинного опору та необхідність враховувати ступінь важкості ДМАП для визначення алгоритму обстеження з можливим виконанням попереджуючих операцій до виникнення тромбозу ЗАР, характеру та інтенсивності консервативного лікування після артеріальних реконструкцій у хворих на ЦД із ХКІНК.

Паралельно з наведеними дослідженнями ми вивчили результати гібридних реконструктивних хірургічних втручань на артеріях у 75 хворих на цукровий діабет, II типу з ХКІНК на тлі СОУ артерій інфраінгвінального сегменту в поєднанні з виразково-некротичним ураженням стопи.

Протягом періоду спостереження, який дорівнював 12 міс., у 11 (14,7%) хворих виник тромбоз

ЗАР. Із метою покращення результатів лікування нами був запропонований алгоритм післяопераційного обстеження хворих з урахуванням наявності у них факторів ризику рецидиву СОУ і тромбозу ЗАР та в шляхах припливу і відтоку.

На нашу думку, високий ризик розвитку тромбозу ЗАР, найбільш вірогідний у хворих, котрі мають фактори ризику, наведені в таблиці 3, до якої, як фактор ризику ми включили ступінь тяжкості ДМАП.

Таблиця 3

Фактори ризику розвитку тромбозу ЗАР

Критерій	Кількість балів		
	0	1	2
Ступінь периферичного опору (за Rutherford R.V. et al., 1997)	<5	від 5 до 7	від 8 до 10
Паління	не палив	кинув	продовжує
Індекс маси тіла	<30	30-40	>40
Інфаркт міокарда та/або інсульт в анамнезі	не було	одна подія	більше однієї події
Стать		жіноча	чоловіча
Цукровий діабет	компенсація	субкомпенсація	декомпенсація
Миготлива аритмія	відсутня	корегована	некорегована
Ступінь важкості ДМАП	легкий	середній	важкий
Тромбоз зони реконструкції в ранньому післяопераційному періоді	не було		був
Виконана реконструктивна операція		в межах одного артеріального сегмента	багаторівнева або гібридна артеріальна реконструкція
Ампутація в анамнезі	не було	в межах стопи	висока

При підсумовуванні кількості балів визначали тактику обстеження хворих у післяопераційному періоді:

- при сумі балів меншій за 10 показано визначення індексу регіонарного систолічного тиску (ІРСТ) і контрольна ультразвукова доплерографія (УЗДГ) через 3, 6, 12 міс – далі 2 рази на рік;

- при сумі балів 10–16 – визначення ІРСТ і контрольна УЗДГ кожні 3 міс;

- при сумі балів 17–22 – визначення ІРСТ і контрольна УЗДГ кожні 3 міс + через 6 міс контрольна ангіографія і далі 1 раз на рік – контрольна ангіографія.

Запорукою уникнення ускладнень у вигляді СОУ в ЗАР та шляхах припливу і відтоку, та, як наслідок, тромбозу ЗАР є своєчасне обстеження оперованих хворих і, за потреби, виконання попереджувачих тромбоз втручань (зазвичай – балонної ангіопластики). Найбільш доступним і безпечним методом діагностики є УЗДГ, яка дозволяє визна-

чити пікову систолічну швидкість кровотоку, виявити стенози ЗАР, а також артерій припливу і відтоку, але найбільш інформативним методом діагностики стану артеріального русла у оперованих хворих та таким, що дозволяє виставити показання до попереджувачої операції вважали рентгенконтрастну ангіографію.

**Висновки 1.** Сукупність отриманих даних про якісні та кількісні зміни ГМЦР шкіри дозволила розробити критерії для розрахунку ПСДМ.

2. Виявлена кореляція між ступенем діабетичної мікроангіопатії та ймовірністю тромбозу після гібридної артеріальної реконструкції.

3. Визначення ступеня тяжкості діабетичної мікроангіопатії може бути використане при створенні алгоритму обстеження для встановлення показань до превентивних операцій, що попереджують тромбоз ЗАР та характеру консервативного лікування після артеріальних реконструкцій у хворих на ЦД із ХКІНК.

**Інформація про конфлікт інтересів.** Конфлікту інтересів немає.

**Інформація про фінансування.** Автор гарантує, що він не отримувал жодних винагород у будь-якій формі, здатних вплинути на результати роботи.

**Особистий внесок кожного автора у виконання роботи:**

Діденко С.М. – ідея, мета, збір матеріалу дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка тексту статті.

#### Список використаної літератури

1. Fisher M, McMurray J J. Epidemiology of Vascular Disease in Diabetes. Diabetic Cardiology. John Wiley&Sons, UK, 2007, 422 p. DOI: 10.1002/9780470723807

2. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes / T. Thiruvoipati, C.E. Kielhorn, E.J. Armstrong // World Journal of Diabetes.–2015–Vol.6: – P.961–969. DOI:10.4239/wjd.v6.i7.961
3. Spanos K., Antoniou G. A., Saleptsis V., Athanasoulas A., Drakou A., Koutsias S. et al. Hybrid procedures for chronic lower limb ischemia: what determines the outcome? Int Angiol. 2017Apr;36(2):174-181.doi:10.23736/S0392-9590.16.03684-1.
4. Schram M., Stehouwer C. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. Horm. Metab. Res. 2005, №1(37): 49-55.DOI: 10.1055/s-2005-861363
5. Walsh D. Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. Adv. Clin. Chem. 2007, 1(44): P. 187-221. PMID:17682343

**Стаття надійшла до редакції: 20.01.2020 р.**