

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Зайцева Екатерина Леонидовна

**Клинические, морфологические и иммуногистохимические особенности
репарации мягких тканей нижних конечностей у больных с синдромом
диабетической стопы на фоне различных методов местного лечения**

14.01.02 – эндокринология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Токмакова А.Ю.

Москва – 2015 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ:

| | |
|--|----|
| Введение..... | 5 |
| Глава 1. Обзор литературы..... | 12 |
| 1.1 Синдром диабетической стопы. Определение. Классификация. Факторы риска..... | 12 |
| 1.2. Поражения кожи при сахарном диабете..... | 16 |
| 1.3. Особенности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с сахарным диабетом..... | 18 |
| 1.4. Современные принципы и методы местного лечения хронических ран нижних конечностей у лиц с сахарным диабетом..... | 25 |
| 1.5. Применение терапии отрицательным давлением при синдроме диабетической стопы..... | 34 |
| 1.6. Влияние коллаген-содержащих повязок на заживление ран при сахарном диабете..... | 43 |
| Глава 2. Материалы и методы исследования..... | 46 |
| 2.1. Объект исследования..... | 46 |
| 2.2. Методы исследования..... | 49 |
| 2.2.1. Лабораторные методы исследования..... | 50 |
| 2.2.2. Инструментальные методы исследования..... | 51 |
| 2.2.3. Морфологическое исследование..... | 53 |
| 2.3. Статистические методы анализа данных..... | 57 |
| Глава 3. Результаты..... | 58 |
| 3.1. Характеристика обследованных больных до начала местного лечения ран..... | 56 |
| 3.1.1. Клиническая характеристика..... | 59 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2. Микрососудистые осложнения сахарного диабета у обследованных больных..... | 61 |
| 3.1.3. Результаты лабораторных исследований обследованных групп..... | 62 |
| 3.1.4. Сопутствующие заболевания у лиц, включенных в обследование..... | 64 |
| 3.1.5. Состояние микроциркуляторного русла у пациентов до начала терапии..... | 65 |
| 3.1.6. Состояние раневых дефектов в исследуемых группах до начала терапии..... | 66 |
| Глава 3.2. Морфологические особенности течения раневого процесса у лиц с синдромом диабетической стопы до лечения..... | 68 |
| 3.2.1. Гистологическая характеристика раневых дефектов до лечения..... | 68 |
| 3.2.2. Иммуногистохимические особенности течения раневого процесса у лиц с синдромом диабетической стопы до лечения..... | 71 |
| Глава 4. Характеристика пораженной зоны нижних конечностей обследованных больных после лечения..... | 77 |
| 4.1. Клиническая характеристика раневых дефектов стоп у пациентов после лечения..... | 77 |
| 4.1.1. Влияние терапии отрицательным давлением на процесс заживления ран по сравнению с контрольной группой..... | 77 |
| 4.1.2. Изменения локальной микрогемодинамики на фоне терапии отрицательным давлением по сравнению со стандартной терапией..... | 80 |
| 4.1.3. Результаты терапии коллаген-содержащими повязками по сравнению с контрольной группой..... | 81 |
| 4.1.4. Изменения локальной микрогемодинамики на фоне терапии коллагеном и стандартного лечения..... | 83 |
| 4.1.5. Клинические случаи применения различных видов местного лечения у лиц с нейропатической и нейроишемической формой синдрома диабетической стопы..... | 84 |
| Глава 4.2. Морфологическая характеристика репаративных процессов мягких тканей нижних конечностей на фоне проводимого лечения..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.1. Влияние терапии отрицательным давлением на заживление ран нижних конечностей при синдроме диабетической стопы..... | 98 |
| 4.2.2. Влияние коллаген-содержащих повязок на процессы репарации у лиц с синдромом диабетической стопы..... | 100 |
| Глава 4.3. Иммуногистохимические особенности заживления ран у лиц синдромом диабетической стопы на фоне проводимого местного лечения..... | 102 |
| Глава 4.3.1 Иммуногистохимическая характеристика процессов репарации на фоне терапии отрицательным давлением..... | 102 |
| 4.3.2 Иммуногистохимические особенности репаративных процессов мягких тканей нижних конечностей на фоне терапии коллаген-содержащими повязками..... | 104 |
| Глава 4.5. Влияние различных факторов на процессы заживления ран нижних конечностей у лиц с синдромом диабетической стопы..... | 106 |
| Глава 5. Обсуждение..... | 108 |
| Глава 6. Выводы..... | 129 |
| Глава 7. Практические рекомендации..... | 131 |
| Список принятых сокращений..... | 132 |
| Список литературы..... | 134 |

Введение

Актуальность проблемы

Сахарный диабет является одной из важнейших медико-социальных проблем. Согласно данным, представленным Международной федерацией диабета в 2014 году, количество лиц, страдающих сахарным диабетом (СД), в мире насчитывает 382 миллиона человек [3].

Одним из наиболее грозных осложнений этого заболевания является синдром диабетической стопы. Данное состояние приводит как к снижению качества жизни пациента, так и к значительным финансовым затратам самого пациента и всей системы здравоохранения на его лечение [69].

У 30-80% пациентов с СД регистрируются хронические раневые дефекты мягких тканей нижних конечностей различного генеза. Более чем в половине случаев течение раневого процесса у лиц с данной патологией крайне длительное и может сопровождаться присоединением раневой инфекции и болевого синдрома. Раны могут быть резистентными к лечению, что приводит к снижению качества жизни пациентов, и представляет непосредственную опасность последующей ампутации. Даже в том случае, когда радикального хирургического вмешательства удастся избежать, долгосрочное и крайне дорогостоящее лечение трофических нарушений мягких тканей нижних конечностей ведет к огромным затратам как материальных средств, так и времени медицинского персонала.

Согласно международным рекомендациям по лечению больных с синдромом диабетической стопы (СДС), одним из необходимых компонентов комплексной терапии является очищение раны, для чего используются различные методики (хирургическая обработка, гидрохирургия, энзиматическое очищение, ультразвуковая кавитация и так далее) [79; 80].

Хирургическая обработка раны – наиболее распространенный и доступный в широкой клинической практике метод борьбы с раневой инфекцией, который проводится подавляющему большинству пациентов с раневыми дефектами II-III степени по Wagner, позволяющий значительно сократить затраты на антибактериальную и антисептическую терапию. Следующим этапом лечения должна стать подготовка к закрытию раны (пластическое закрытие местными тканями или достижение заживления вторичным натяжением). Однако, на сегодняшний день, отсутствует четкий алгоритм ведения больных СД после хирургической обработки раны, не установлены оптимальные сроки и методы подготовки раны к следующему этапу лечения, отсутствуют критерии оценки состоятельности грануляционной ткани. Это приводит к увеличению сроков пребывания больного в стационаре, ухудшает долгосрочный прогноз за счет рецидивирования раневых дефектов, развившихся вследствие формирования несостоятельных рубцов, что требует проведения повторных оперативных вмешательств, значительно повышает стоимость лечения и снижает качество жизни данной категории больных.

Известно, что ведущую роль в формировании зрелой грануляционной ткани играет метод местного воздействия. В последние годы предложен целый ряд высокотехнологичных средств местного лечения (атравматические раневые покрытия, повязки с коллагеном и ростовыми факторами, терапия отрицательным давлением, генно-инженерные аналоги кожи человека), позволяющих не только предотвратить вторичное инфицирование и травмирование раны, но и влияющих на различные параметры формирующейся грануляционной ткани. Однако эффективность этих средств ранее оценивалась либо на экспериментальных моделях, либо у пациентов с острыми ранами и без нарушений углеводного обмена. Не изучено влияние современных раневых покрытий на состояние периферической микроциркуляции и созревание грануляционной ткани, что может играть определяющую роль в эффективности проводимого лечения и последующей реабилитации.

Обычно в клинической практике оцениваются лишь внешние характеристики формирующейся грануляционной ткани, что является недостаточным и может привести к ошибкам в лечении. На сегодняшний день малоизученными остаются такие показатели состоятельности грануляционной ткани, как скорость неоваскулогенеза, протеолитическая активность, количество макрофагов, как основного источника факторов роста, необходимых для заживления. Показателями этих процессов являются маркер эндотелия сосудов (антитело CD31), активность матриксных металлопротеаз (ММР-9) и тканевого ингибитора металлопротеаз (TIMP-1), маркер макрофагов (CD68), матриксно-клеточный белок остеопонтин. В связи с этим представляется целесообразным изучить особенности изменений данных показателей, отражающих тканевую репарацию на фоне различных методов местного лечения у лиц с СД.

Цель работы:

Оценить влияние различных методов местного воздействия на репарацию тканей у больных с синдромом диабетической стопы для оптимизации тактики и повышения эффективности лечения язвенных дефектов стоп у данной категории пациентов.

В соответствии с поставленной целью работы были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. Оценить интенсивность репаративных процессов у лиц с нейропатической и нейроишемической (без критической ишемии) формами синдрома диабетической стопы после первичной хирургической обработки раневого дефекта.

2. Изучить клинические особенности процесса заживления раневых дефектов стоп на фоне терапии отрицательным давлением, коллагенсодержащими и атравматическими повязками.
3. Изучить изменения локальной микрогемодинамики по данным транскутанной оксиметрии на фоне различных методов местного воздействия
4. Изучить гистологические и иммуногистохимические особенности заживления на фоне использования различных средств закрытия ран.
5. Оценить влияние терапии отрицательным давлением, коллагенсодержащих и атравматических повязок на скорость неоваскулогенеза.
6. Изучить уровень протеолитической активности грануляционной ткани до и после применения различных методов местного лечения.

Научная новизна:

Впервые в мире будет выполнена комплексная оценка клинических, гистологических и иммуногистохимических особенностей репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с синдромом диабетической стопы на фоне различных видов местного лечения.

Впервые в Российской Федерации будет проведена сравнительная оценка эффективности современных методов местного воздействия у пациентов с различными формами синдрома диабетической стопы.

Впервые в Российской Федерации будет изучено влияние средств местного лечения на локальную микрогемодинамику.

Теоретическая и практическая значимость:

Будет оценено влияние различных методов местного лечения ран на сроки подготовки к следующему этапу лечения, интенсивность болевого синдрома.

Будет предложен алгоритм периоперационного ведения больных сахарным диабетом с хроническими раневыми дефектами стоп.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

Репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей замедлены у лиц с сахарным диабетом.

Различные виды местного лечения ран по-разному влияют на интенсивность процессов заживления у больных сахарным диабетом.

Вид местного лечения может влиять на локальную микрогемодинамику в окружающих рану тканях.

Внедрение результатов исследования:

Результаты работы внедрены в практику отделения диабетической стопы ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ.

Апробация работы:

Официальная апробация работы состоялась 22 июня 2015 года на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ.

Материалы работы доложены на:

VI Всероссийском конгрессе эндокринологов 2012 в Москве;

European Wound Management association conference 2013 в Копенгагене;

European Wound management association conference 2014 в Мадриде;

European Young Endocrine Scientists 2nd meeting 2014 в Белграде;

Young Active research in Endocrinology 2014 в Гамбурге;

II Всероссийском конгрессе «Инновационные технологии в эндокринологии» 2014 в Москве;

VII International symposium on the diabetic foot 2015 в Гааге.

Публикации по теме исследования:

1. Зайцева Е.Л., Токмакова А.Ю. «Вакуум-терапия в лечении хронических ран»// Сахарный диабет – 2012. - №3. с.45-49.
2. Галстян Г.Р., Доронина Л.П., Зайцева Е.Л. «Синдром диабетической стопы в практике хирурга амбулаторного звена»//Consilium medicum приложение Хирургия - 2013 - №1. с.29-37
3. Зайцева Е.Л., Токмакова А.Ю. «Роль факторов роста и цитокинов в репаративных процессах в мягких тканях у больных сахарным диабетом»// Сахарный диабет. 2014; №1: с. 57-62.
4. Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.А., Митиш В.А., Токмакова А.Ю. «Влияние терапии отрицательным давлением на репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы»// Сахарный диабет. 2014. №3. с. 113-120
5. Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.А., Митиш В.А., Токмакова А.Ю. «Особенности репарации тканей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы на фоне терапии отрицательным давлением»// Вестник хирургии им.Грекова. 2014. № 5. с.64-73
6. Токмакова А.Ю., Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.А. «Влияние местного применения коллагена на активность репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у больных с синдромом диабетической стопы»// Терапевтический архив – в печати
7. E. Zaytseva, A. Tokmakova. “Clinical case of diabetic foot ulcer treated with VAC-therapy”// Abstract book of 23th EWMA conference 15-17 may 2013
8. E. Zaytseva, L. Doronina, R. Molchkov , A. Tokmakova. “Clinical and histological progress of diabetic foot ulcers under NPWT”// Abstract book of 24th EWMA conference 14-16 may 2014

9. Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.А., Токмакова А.Ю. «Влияние терапии отрицательным давлением на репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы»// Сборник тезисов II Всероссийского конгресса ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЭНДОКРИНОЛОГИИ с участием стран СНГ, Москва 25-28 мая 2014, с.119
10. E.Zaytseva, L.Doronina, R.Molchkov, I.Voronkova, V.Mitish, A.Tokmakova. “Effects of negative pressure wound therapy on tissue repair in patients with diabetic foot ulcers”//Abstract book of 2nd EYES Meeting, Belgrade 24-26 September 2014 , p.26
11. E.Zaytseva, L.Doronina, R.Molchkov, I.Voronkova, V.Mitish, A.Tokmakova. Negative pressure wound therapy effects on tissue repair in patients with diabetic foot ulcers// Abstract book of 26th YARE conference 10-12 October 2014
12. Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.А., Токмакова А.Ю. «Особенности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы на фоне различных методов местного лечения»// Сборник тезисов VII Всероссийского диабетологического конгресса «Сахарный диабет в XXI веке – время объединения усилий», Москва 25-27 февраля 2015, с.179-180
13. E.Zaytseva, L.Doronina, R.Molchkov, I.Voronkova, V.Mitish, A.Tokmakova. Soft tissue repair changes in patients with diabetic foot ulcers after NPWT and standard management // Abstract book of 7th international symposium on the diabetic foot, Hague, 19-23 May , 2015

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста; состоит из введения, семи глав, выводов и практических рекомендаций, иллюстрирована 26 рисунками и 8 таблицами.

Библиография состоит из 134 наименований: 19 работ отечественных и 115 работа зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синдром диабетической стопы. Определение. Классификация.

Факторы риска.

Согласно международному соглашению по диабетической стопе от 1999 года, синдром диабетической стопы понимают как «инфекция, язва и/или деструкция глубоких тканей, связанная с нарушением функции периферических нервов и/или снижением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей различной степени выраженности»[9;67].

Патогенез развития синдрома диабетической стопы включает влияние сенсомоторной и автономной нейропатии. Снижение периферической чувствительности, деформация стопы, сухость кожи и нарушение кровоснабжения в системе микроциркуляторного русла являются составляющими нейропатической формы синдрома диабетической стопы [7; 124].

В мировой клинической практике принята единая классификация СДС, согласно которой различают три основные клинические формы [1]:

1. Нейропатическая форма:
 - а) трофическая язва стопы;
 - б) диабетическая остеоартропатия (стопа Шарко).
2. Ишемическая форма (окклюзирующее заболевание артерий нижних конечностей предшествует СД).
3. Нейроишемическая форма.

Методы оценки раневого дефекта

Каждый осмотр раны (трофической язвы) должен включать ее измерение (длина, ширина, глубина и окружность) с последующим вычислением площади и объема.

Для измерения площади раны существуют разные методики, такие как измерение линейкой, перенесение очертаний раны на пленку с ручным подсчетом площади или механическая планиметрия, цифровая фотография и компьютерная планиметрия с использованием краевой видеометрии (VeV), стереофотограмметрия (SPG) и т.д. [17].

Существуют различные классификации раневых дефектов при сахарном диабете, включающие такие параметры, как глубина повреждения, наличие инфекции и ишемии, характер и количество экссудата.

Наиболее популярной является классификация по Вагнеру [1], где:

0-я степень - Раневой дефект отсутствует, но есть сухость кожи, клювовидная деформация пальцев, выступание головок метатарзальных костей, другие костные и суставные аномалии

1-я степень - Поверхностный язвенный дефект без признаков инфицирования

2-я степень - Глубокая язва, обычно инфицированная, но без вовлечения костной ткани

3-я степень - Глубокая язва с вовлечением в процесс костной ткани, наличием остеомиелита

4-я степень - Ограниченная гангрена (пальца или отдела стопы)

5-я степень - Гангрена всей стопы

Данная классификация позволяет ранжировать раневые дефекты в зависимости от глубины повреждения и наличия инфекции.

Также распространена классификация техасского университета, в которой учитываются такие параметры, как глубина повреждения, наличие ишемии и инфекции [2; 23].

| Стадия | Степень | | | |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|--|--|
| | Степень 0. Полностью эпителизирован ное поражение | Степень 1. Поверхностная рана | Степень 2. Рана проникает в сухожилие или капсулу сустава | Степень 3. Рана проникает в кость или сустав |
| А. нет инфекции и ишемии | 0А | 1А | 2А | 3А |
| В. инфекция | 0В | 1В | 2В | 3В |
| С. ишемия | 0С | 1С | 2С | 3С |
| Д. инфекция+ ишемия | 0D | 1D | 2D | 3D |

Для удобства клиницистов в 2004 г. было предложено ведение медицинской документации пациентов с хроническими раневыми дефектами по системе MEASURE, включающей в себя ключевые параметры, используемые при их оценке в процессе лечения: М (Measure) – измерение раны (длина, ширина, глубина и площадь), Е (Exudate) – экссудат (количество и качество), А (Appearance) – внешний вид (раневое ложе, тип ткани и количество), S (Suffering)

– болевой синдром (характер и интенсивность боли), U (Undermining) – деструкция (наличие или отсутствие), R (Reevaluate) – наблюдение (регулярный контроль всех параметров), E (Edge) – край (состояние краев раны и окружающей кожи) [17].

Данная система предназначена для стандартизации терминологии и определения последовательности подходов в клинической оценке раны. Она также может быть использована как основа для создания последовательных описаний статуса раны при каждом осмотре и для заполнения принятых в каждом учреждении карт технологического процесса.

В группу риска развития СДС входят [1; 6]:

- 1) пациенты со сниженной функцией периферической нервной системы (периферическая сенсомоторная и автономная нейропатия);
- 2) лица с заболеваниями периферических артерий;
- 3) больные с деформациями стоп любого генеза, наличием зон повышенного давления на стопу
- 4) пациенты, перенесшие травму стопы
- 5) лица с неудовлетворительным гликемическим контролем
- 6) больные с наличием язвы и/или ампутаций в анамнезе
- 7) слепые и слабовидящие;
- 8) больные диабетической нефропатией и хронической почечной недостаточностью;
- 9) одинокие и пожилые пациенты;
- 10) злоупотребляющие алкоголем;
- 11) курильщики.

1.2. Поражения кожи при сахарном диабете.

Согласно данным литературы, насчитывается порядка 30 видов заболеваний кожи, связанных с сахарным диабетом [14].

Механизмы поражений кожи при СД малоизученны. Предполагается, что в основе патогенеза лежат такие факторы, как накопление конечных продуктов метаболизма, микрососудистые осложнения сахарного диабета, а также нарушения местного иммунитета [63].

К поражениям кожи при СД относят: дерматозы, обусловленные нарушением метаболических процессов (липоидный некробиоз, диабетическая дерматопатия, диабетические буллы, эруптивные ксантомы, acanthosis nigricans), бактериальные и грибковые инфекции, ятрогенные поражения кожи при сахарном диабете [109].

Зачастую, у лиц сахарным диабетом имеется не только поражение артериального русла, но и венозная недостаточность. Провоцирующими факторами данного состояния являются избыточный вес и пожилой возраст.

Лечение венозных язв и пролежней при сахарном диабете существенно не отличаются от общепринятых принципов ведения хронических ран и заключаются в [108; 129]:

1. эластической компрессии (в случае венозных ран) и устранении избыточного давления на пораженную область (при пролежнях)
2. контроле инфекции
3. обработке раневого дефекта
4. подборе перевязочного средства
5. хирургическом лечении варикозной болезни

6. использовании вспомогательных методов лечения, таких как терапия отрицательным давлением, гипербарическая оксигенация
7. длительном периоде наблюдения.

1.3 Особенности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с сахарным диабетом

В норме заживление раны включает в себя четкую последовательность как биологических, так и молекулярных процессов, и начинается с миграции и пролиферации клеток в зоне повреждения, перестройки экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), а заканчивается ремоделированием вновь образованных тканей и сосудов. Эффективная репарация не состоится без своевременного и точного клеточного ответа, заключающегося в активации кератиноцитов, фибробластов, эндотелиальных клеток, макрофагов и тромбоцитов [54; 73; 113;128]. Вышеперечисленные клетки вырабатывают различные факторы роста и цитокины, играющие ключевую роль в регуляции раневого процесса и достижении эпителизации [59;60;99; 102].

Хорошо известно, что при длительном и плохо контролируемом СД процесс заживления ран может быть замедлен как за счет снижения экспрессии местных факторов роста, так и вследствие развития поздних микро- и макрососудистых осложнений. Риск формирования трофических язв и их последующее инфицирование значительно повышается в условиях снижения периферической чувствительности, нарушения местной микрогемодинамики и хронической гипергликемии [37; 98].

Несмотря на актуальность проблемы и достаточный клинический опыт в ее разрешении, молекулярные механизмы репарации мягких тканей у больных СД остаются малоизученными. Это создает трудности в выборе и эффективном использовании соответствующих современных средств местного лечения ран у данной категории пациентов и ведет как к увеличению прямых экономических затрат, так и к ухудшению терапевтического прогноза [37].

В настоящее время в мире проводится достаточное количество исследований роли цитокинов, ростовых факторов в заживлении при СД, однако единой оценки роли этих молекул в репарации до сих пор не сформировано.

Хронической следует считать рану, не заживающую в течение периода, который является нормальным для ран подобного типа и локализации [85]. Такая рана задерживается на одной из фаз заживления. При остром раневом процессе имеется четкая последовательность этапов заживления и процессов продукции и деградации белковых структур. В случае с хроническим раневым дефектом данный баланс нарушен.

Гипергликемия является одной из причин нарушения иммунных реакций, что значительно повышает риск присоединения вторичной инфекции. Кроме того, гликирование белков нарушает их структуру и функцию, что ведет к развитию микрососудистых осложнений сахарного диабета [7; 28].

Как было показано в эксперименте, высокая концентрация глюкозы ведет к замедлению пролиферации человеческих фибробластов в культуре клеток, бычьих эндотелиальных клеток, первичных кератиноцитов кожи мышей [75;133]. Фибробласты становятся нечувствительными к стимуляции факторами роста. В условиях избытка глюкозы эндотелиальные клетки и макрофаги человека, также как и эндотелиальные клетки сосудов кожи быка, начинали вырабатывать большее количество матриксных металлопротеаз (ММР) [34].

Доказано, что у пациентов с сахарным диабетом снижается количество продуцируемого фибробластами коллагена, что ведет к замедлению сокращения раны. Также нарушение углеводного обмена влечет за собой повышение ММР и снижение оксида азота (NO), трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), что вызывает замедление процессов формирования ЭЦМ [20;56].

Взаимодействие гликированного коллагена с ЭЦМ и фибробластами или эндотелиальными клетками препятствует адгезии клеток, их пролиферации и сокращению раны [33;34;83].

Раны при диабете имеют более продолжительную фазу воспаления, сниженную активность воспалительных клеток и замедленную перестройки ЭЦМ.

Именно эти нарушения способствуют переходу раны из острой в хроническую [37].

Ferguson с коллегами зафиксировали у пациентов с СД снижение количества воспалительных клеток, отсутствие роста и миграции эпидермальных клеток, а также сужение просвета и окклюзию артериол и венул в дне раны [55].

Снижение фагоцитарной активности лейкоцитов на фоне метаболических нарушений у лиц с СД приводят к замедлению процессов миграции нейтрофилов и макрофагов в рану. Данные клеточные нарушения значительно повышают риск инфицирования раневых дефектов у данной категории пациентов [29; 30; 52].

В ходе ряда проведенных исследований у лиц с нарушениями углеводного обмена зафиксировано снижение активности или замедление синтеза факторов роста [54;58;59; 95], нарушение процессов ангиогенеза [25; 54], функционирования макрофагов [56] и аккумуляции коллагена, а также нарушение барьерной функции эпидермиса и качества грануляционной ткани [54]. Также отмечена дезорганизация процессов миграции и пролиферации кератиноцитов и фибробластов, снижение количества нервных волокон эпидермиса [84;86], замедление репарации костной ткани, нарушение баланса между аккумуляцией компонентов ЭЦМ и их ремоделированием с помощью MMP [60].

Одним из факторов нормального заживления ран является достаточное насыщение тканей кислородом за счет формирования сосудистой сети. Это определяет особый интерес к оценке роли сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), а также маркера ангиогенеза – CD31 в процессе заживления диабетических ран. Известно, что VEGF стимулирует неоангиогенез и, таким образом, повышает насыщение тканей кислородом (pO_2) [74; 127]. Снижение экспрессии данного фактора роста теоретически должно приводить к замедлению процесса эпителизации [25], однако в работе Galkowska зафиксировано, что уровень экспрессии эндотелием VEGF и рецепторов к нему был сопоставим с группой пациентов без сахарного диабета [61].

В исследовании Dinh было показано, что количество сосудов, окрашенных с помощью антител к CD31, а также определенных с помощью световой

микроскопии, было выше у лиц с сахарным диабетом, чьи раневые дефекты быстрее эпителизировались, чем в группе с длительно незаживающими трофическими язвами нижних конечностей [52].

Важную роль в процессе заживления играют макрофаги. Они считаются одними из основных клеток в репарации, так как участвуют в очищении раны и выработке большого количества цитокинов и факторов роста.

Макрофаги являются популяцией клеток, чья пластичность позволяет им эффективно отвечать на сигналы из окружающих тканей и менять свой фенотип [63;64]. Макрофаги влияют на заживление ран путем синтеза различных факторов роста, таких как VEGF, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), а также влияют на содержание ЭЦМ и его ремоделирование [88; 106].

Существует два вида макрофагов – классически активированные макрофаги (M1) и альтернативно активированные макрофаги (M2). Уровень последних повышается в результате индукции интерферона- гамма в комбинации с фактором некроза опухоли альфа (TNF- α). M1 являются провоспалительными и разрушают нормальные клетки путем апоптоза, а также вырабатывают большое количество провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, TNF, IL-6 и оксид азота. M2 - макрофаги, способствующие заживлению, экспессируют такие противовоспалительные медиаторы как антагонист рецепторов IL-1, который блокирует рецептор 2 типа к IL-1 и IL-10 посредством продукции факторов роста (TGF- β , VEGF и инсулиноподобный фактор роста -1 (IGF-1)) [48; 75; 111].

M1 появляются на этапе воспаления и очищения, в то время как M2 начинают определяться в ране на этапе ангиогенеза и ремоделирования ткани [63;64]. Переход от M1 к M2 считается необходимым условием для перехода раневого процесса из фазы воспаления в фазу пролиферации [94], что подтверждается исследованиями *in vitro*, где прослежена способность макрофагов трансформироваться из провоспалительного фенотипа M1 в способствующий заживлению M2 [39;118].

В исследовании Tang с соавторами также зафиксировано постепенное снижение количества макрофагов на пятые сутки повреждения у лабораторных животных с сахарным диабетом по сравнению с контрольной группой [119].

В процессах заживления немаловажную роль играет и матриксно-клеточный белок остеопонтин (OPN). Он регулирует клеточную адгезию и миграцию, а также участвует в формировании грануляционной ткани.

В литературе встречаются противоречивые данные об источнике остеопонтина в тканях. Так, Mori в своем исследовании выявил, что PDGF, вырабатываемый макрофагами, стимулирует выработку остеопонтина фибробластами [90]. В других работах в ходе эксперимента на миокарде, коже и других тканях, было выявлено, что макрофаги на ранних фазах заживления продуцируют остеопонтин [49;97].

В эксперименте на животных с сахарным диабетом в качестве лечения хронических ран применялись мезенхимальные клетки. Было зафиксировано повышение уровня остеопонтина в ответ на введение мезенхимальных клеток в участок раневого дефекта. Данный матриксный белок стимулировал неоваскуляризацию и улучшал локальную микрогемодинамику, тем самым ускоряя процесс заживления. На основании этого было высказано предположение, что остеопонтин вырабатывается мезенхимальными клетками. Также было установлено, что повышение уровня остеопонтина стимулировало мезенхимальные клетки и усиливало их миграцию в рану и, таким образом, индуцировало их дифференцировку в различные клетки, участвующие в процессе заживления [64].

В некоторых работах было показано влияние остеопонтина на моноциты и эндотелиальные клетки в дерме [89; 101], миофибробласты, синтез TGF- β и формирование грануляционной ткани [65, 72]. Его продукция макрофагами ограничена в ранних фазах заживления. Остеопонтин участвует не только в образовании коллагена, но и в активации макрофагов и ингибировании ферментов, разрушающих ЭЦМ, таких как MMP [97]. Кроме того, он имеет

различные клеточные эффекты, такие как способность регулировать адгезию и миграцию клеток, влияние на некоторые звенья иммунной системы. Остеопонтин играет ключевую роль во взаимодействии между остеобластами и остеокластами в костном ремоделировании [101].

В процессе заживления ран при сахарном диабете также принимают участие матриксные металлопротеазы. Они, как и другие ферменты, играют важную роль как в миграции клеток, так и синтезе факторов роста и в перестройке ЭЦМ. Подобно «молекулярным ножницам», ММР регулируют деградацию матрикса и передвижение клеток. ММР-9 разрушает пептидные цепи коллагена 4 и 7 типов, являющиеся основными компонентами базальной мембраны. ММР-10 (стромелизин-2) «укорачивает» другие, не содержащие коллаген, составляющие матрикса [22;50;104].

Имеются данные о том, что в процессе нормального заживления фибробласты и миофибробласты вырабатывают тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP). Они замедляют действие ММР и блокируют их активность [22].

Liu et al. по результатам проведенного исследования делает вывод, что высокий уровень ММР-9 в раневой жидкости свидетельствует о воспалении и является маркером плохого заживления ран при сахарном диабете [81]. Muller et al. в своей работе продемонстрировали, что соотношение ММР-9/TIMP-1 может служить предиктором заживления ран при синдроме диабетической стопы [96].

В работе Li et al. было показано, что соотношение ММР-9/TIMP-1 в экссудате снижалось в течение успешно проводимого лечения раневых дефектов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, в отличие от группы с плохо заживающими трофическими язвами, где этот показатель оставался повышенным. [78].

Аналогичные результаты приводит Dinh et al.: по результатам иммуногистохимического исследования уровень ММР-9 был статистически значимо повышен у пациентов с плохим заживлением раневых дефектов при

синдроме диабетической стопы по сравнению с группой без СДС и группой, где язвенные дефекты хорошо поддавались консервативному лечению [51].

Таким образом, процесс заживления ран при сахарном диабете является крайне сложным и не до конца изученным. Представленные результаты исследований свидетельствуют о том, что факторы роста и цитокины играют одну из ведущих ролей в заживлении хронических ран у больных сахарным диабетом. Понимание данных механизмов репарации существенно поможет в поиске путей лечения этой группы больных и позволит значительно улучшить терапевтический прогноз в данной группе пациентов.

1.4. Современные принципы и методы местного лечения хронических ран нижних конечностей у лиц с сахарным диабетом

Согласно рекомендациям международной рабочей группы по диабетической стопе IWGDF 2015 принципы местного лечения ран при сахарном диабете включают в себя [69]:

1. Устранение избыточного давления в области поражения стопы
2. Восстановление артериального кровотока
3. Контроль инфекции
4. Компенсация углеводного обмена и сопутствующих заболеваний
5. Местное лечение ран, включающее:
 - Регулярный контроль состояния раны
 - Очистку раны, в том числе с помощью скальпеля
 - Выбор перевязочного средства, обеспечивающего контроль экссудации и влажной среды в ране
 - Использование терапии отрицательным давлением (NPWT) для лечения послеоперационных ран
 - Применение гипербарической оксигенации при плохо заживающих раневых дефектах
6. Обучение пациентов правилам ухода за ногами
7. Профилактика рецидивов.

Последние годы была предложена теория обработки ран Wound Bed Preparation, принцип, обозначаемый акронимом TIME, включает: T-tissue management

(обработка раны), I – inflammation and infection control (контроль воспаления и инфекции), M – moisture balance (поддержание влажной среды в ране), E – epithelial (edge) advancement – стимуляция эпителизации и динамика сокращения краев раны [112].

Важной составляющей комплексных мер по ведению пациентов с хроническими ранами являются мониторинг, оценка эффективности терапевтических мероприятий и ведение медицинской документации (что является неотъемлемой частью адекватного мониторинга раны; отражает выполнение принятых стандартов лечения, скорость заживления и облегчает взаимодействие врачей разных специальностей; основное требование – фиксация всех параметров дефекта при каждом осмотре с использованием объективных и точных методов измерения и стандартной терминологии) [17].

Хирургическая обработка раны включает в себя удаление некротизированных тканей, наложений фибрина, участков гиперкератоза. Это позволяет устранить основу для развития инфекции. В клинической практике применяют различные методы обработки ран: хирургический, химический, аутолитический и физический [39].

Хирургический метод обработки раны - наиболее доступный и быстрый способ удаления нежизнеспособных тканей.

В связи с нарушениями иммунного клеточного ответа и замедленными процессами заживления, даже поверхностные повреждения нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом часто осложняются присоединением вторичной инфекции.

Выраженность инфекционного процесса в мягких тканях может потребовать проведения различных хирургических вмешательств: от хирургической обработки до резекции пальца и ампутации отдела стопы. Помимо этого должен быть выбран оптимальный метод местного лечения в послеоперационном периоде,

проведена разгрузка пораженной конечности и обеспечен длительный период наблюдения [79]

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению инфекций мягких тканей при СД, после проведения оценки состояния больного, определения характера и причины поражения нижней конечности, исключения наличия ишемии, показано проведение хирургической обработки с иссечением некротизированных тканей. Антибактериальная терапия рекомендуется только после получения результатов бактериологического исследования с определением чувствительности к антибиотикам [79].

В ходе исследования Saar et al. было установлено, что адекватно проведенная хирургическая обработка обеспечивала лучшее и более быстрое заживление ран [110].

Достаточное кровоснабжение абсолютно необходимо для заживления раны, так как обеспечивает доставку нутриентов, кислорода, факторов роста, необходимых для заживления, а так же для удаления из раны продуктов метаболизма, свободных радикалов и углекислого газа. К тому же, у пациентов, получающих антибактериальную терапию, улучшенный кровоток обеспечивает доставку антибиотика в рану [42].

Одним из методов обработки раневого дефекта является ферментативное очищение.

Аутолитическое очищение раны происходит за счет воздействия таких ферментов, как эластаза, коллагеназа, миелопероксидаза, кислая гидролаза и пр. При ферментативном очищении на поверхность раны наносят препараты, которые работают совместно с эндогенными ферментами. Эта методика является одной из наиболее подходящих для удаления струпа на больших ранах у лиц с декомпенсированным хроническим заболеванием, где проведение хирургической обработки невозможно. Перед нанесением ферментов может потребоваться перфорация или надсечение струпа. В ряде случаев применение ферментативных

средств очищения раны может привести к чрезмерному образованию экссудата, мацерации кожи перираневого области и иногда к присоединению инфекции [17].

Одной из задач терапии СДС является контроль инфекции. Основными микроорганизмами, колонизирующими и инфицирующими поврежденные участки кожных покровов, являются золотистый стафилококк (*St. aureus*) и бета-гемолитические стрептококки (групп А, В, С, G). Это обусловлено снижением защитных свойств кожи вокруг язвенных дефектов, в результате чего создаются благоприятные условия для участия в инфекционном процессе микроорганизмов с низкой вирулентностью. При длительно незаживающих язвах кроме грамположительных кокков также выделяются энтеробактерии, в наиболее тяжёлых случаях у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа или на фоне ишемии – облигатные анаэробные микроорганизмы. Спектр инфекций при СДС также зависит от предшествующей антибактериальной терапии. В таких случаях возрастает частота выделения ассоциаций микроорганизмов, полирезистентной микрофлоры, среди которых определяются метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA), синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) и другие грамотрицательные микроорганизмы [19]. Факторами риска инфицирования раневых дефектов стоп при сахарном диабете являются повторные госпитализации, предыдущая длительная терапия антибиотиками широкого спектра действия. [19].

Важно, что если при впервые развившихся острых инфекциях стопы в большинстве случаев наблюдается моноинфекция, вызванная аэробными грамположительными кокками, то при хроническом процессе чаще выявляется инфекция полимикробной этиологии. При тяжёлом гнойно-некротическом поражении у больных сахарным диабетом наиболее часто выделяется смешанная аэробно-анаэробная микрофлора – в 87,7% случаев, только аэробная – в 12,3% [13].

Лечение инфекции при СДС зависит от ее выраженности. Согласно рекомендациям IWGDF 2015 года [69], при поверхностной, слабо

инфицированной ране показано проведение очистки, хирургической обработки раны с иссечением некротизированных тканей и участков гиперкератоза, а также проведение эмпирической пероральной антибактериальной терапии, направленной на *St.aureus* и стрептококковую инфекцию.

В случае наличия глубокой, угрожающей потерей нижней конечности, инфекции, показано:

- срочное хирургическое вмешательство с целью иссечения некротизированных тканей, включая пораженные участки костей,
- санация гнойного очага;
- оценка состоятельности артериального кровотока и при необходимости проведение реваскуляризации,
- незамедлительное начало антибактериальной терапии препаратами широкого спектра действия, направленной на борьбу с грамм-отрицательной, грамм-положительной и анаэробной флорой. При возможности – проведение бактериологического исследования с определением чувствительности к антибиотикам.

Перевязочные средства, применяемые в лечении ран при СД должны отвечать следующим требованиям: быть атравматичными при замене, способными поддерживать в ране умеренно влажную среду (пересушивание раны значительно замедляет заживление), способными полностью поглощать раневое отделяемое (иначе происходит мацерация окружающей кожи, а также гибель клеток грануляционной ткани в слишком влажной среде), обладать барьерными свойствами – предотвращать попадание в рану бактерий и, по возможности, не препятствовать газообмену между поверхностью раны и окружающей средой [18].

Выбор повязки может определяться глубиной язвы и объемом поражения; существенно осложняет ведение раны наличие поражения костей. Стратегически важным для выбора повязки является фаза раневого процесса и степень экссудации [5].

В настоящее время в качестве местного лечения хронических ран нижних конечностей при сахарном диабете используются следующие перевязочные средства [17].

1. Губки, гидрофибровые повязки.

Губки и гидрофибровые повязки показаны для лечения мокнущих ран. Они обеспечивают термоизоляцию, обладают высокой поглощающей способностью, поддерживают влажную среду в ране, проницаемы для воздуха, могут легко моделироваться по форме раны и не фрагментируются. У некоторых губок имеются дополнительные слои: со стороны раны – слой, позволяющий избежать прилипания, если рана сухая, и с обратной стороны – полиуретановый слой, предотвращающий избыточную потерю жидкости. Гидрофибровые повязки высоко гигроскопичны и могут задерживать жидкость внутри волокон. Оба этих вида повязок не требуют частой замены и могут находиться на ране сроком до одной недели.

2. Альгинатные повязки.

При контакте с раневой жидкостью альгинат кальция, входящий в состав повязки, образует гель, что способствует поддержанию влажной среды в ране.

Данный вид перевязочного средства идеально подходит для лечения обильно экссудующих и инфицированных ран, способствуя аутолитическому очищению дефекта. Это позволяет избежать образования струпа и ускорить переход раневого процесса из воспалительной стадии в пролиферативную.

3. Гидрогели.

Гидрогели состоят из нерастворимых полимеров (солевых растворов пропиленгликоля, гидроколлоиды и прочее), которые создают высокую концентрацию воды (70–90%). Они применяются для лечения сухих, покрытых струпом ран. Их необходимо менять каждые 24–72 ч.

4. Гидроколлоиды.

При контакте с раневым отделяемым гидроколлоиды создают связанный матриксный гель и предназначены для аутолитического очищения ран со средней и умеренной экссудацией.

Данные раневые покрытия герметично закрывают рану, обеспечивая анаэробную среду, что предотвращает избыточный рост грануляций. Гидроколлоиды абсолютно противопоказаны при лечении ран ишемического генеза. Пектин, входящий в состав повязки, способствует фибринолитической активности, а низкий уровень рН оказывает слабое антибактериальное действие. Оклюзия достигается с помощью фиксирующей губки или пленки. Время пребывания повязки на ране от 2 до 7 дней.

5. Пленочные повязки.

Пленочные повязки применяются на более поздних стадиях заживления раны, когда отсутствует выраженная экссудация. Многие из них проницаемы для водных испарений и кислорода, но непроницаемы для жидкости и микроорганизмов. Пленочные повязки производятся в адгезивной и неадгезивной форме и могут быть оставлены на ране в течение длительного периода.

Новые альтернативные методы местного лечения

«Живая искусственная кожа». В настоящее время существуют разные заменители кожи, применяемые для лечения хронических ран различной этиологии, в том числе и при СДС. Это биоинженерные продукты (Episcel,

Laserskin; AlloDerm, Lifecell; TransCyte, Smith and Nephew and advanced tissue services; Apligraf, Organogenesis; Dermagraft, Advanced Biohealing и пр.), представляют собой двухслойную культуру тканей: живые клетки дермы в пласте межклеточного матрикса, покрытые живым эпителием. При инкубации материала в питательной среде нанесенные на него разрезы заживают спонтанно. В настоящий момент их рекомендуют применять при неудовлетворительной репарации, несмотря на адекватное лечение, при больших размерах язвы [18].

Одним из перспективных направлений в лечении хронических раневых дефектов является применение ростовых факторов. В настоящее время на зарегистрированы такие средства, как препараты рекомбинантного человеческого тромбоцитарного фактора роста (Регранекс), рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (Эбермин, Биоплен-ЭФР, Эберпрот П), продолжаются исследования препаратов рекомбинантного фактора роста фибробластов (TraferminR spray, Fiblast-sprayR). В ходе проведенных исследований выявлено статистически достоверное улучшение и сокращение сроков заживления язвенных дефектов при СДС на фоне применения рекомбинантных факторов роста ($p < 0,01$) [31].

Хронический раневой процесс часто осложняется наличием болевого синдрома. У пациентов с сахарным диабетом боль может возникать независимо от травмы или раневого дефекта и быть результатом диабетической нейропатии.

Было показано, что наличие болевого синдрома может также оказывать негативное влияние на заживление ран [115]. Помимо снижения качества жизни больных и их приверженности лечению, боль являлась стрессорным фактором для организма, приводящим к синтезу избыточного количества провоспалительных цитокинов и повышению уровня кортизола. Данные изменения снижают иммунитет, что может отразиться на процессах заживления [116].

Наиболее выраженные болезненные ощущения пациенты с хроническими ранами могут испытывать при смене повязки [105; 116], таким образом, крайне

важным условием эффективности местного лечения также является атравматичность перевязочного средства при его замене.

Вспомогательными средствами, применяемыми в лечении хронических ран нижних конечностей у лиц с сахарным диабетом, являются биоинженерные аналоги кожи, экстрацеллюлярные клеточные белки, факторы роста, терапия отрицательным давлением, повязки на основе коллагена и пр.

1.5. Применение терапии отрицательным давлением при синдроме диабетической стопы

Терапия отрицательным давлением (negative pressure wound therapy (NPWT), вакуум-терапия, vacuum-assisted closure (VAC), topical negative pressure treatment (TNP)) – один из методов местного лечения, применяемый для стимуляции заживления ран. Он используется как для первичного лечения хронических и осложненных ран, так и в дополнение к консервативной терапии или при подготовке раны к пластическому закрытию.

История применения данной методики насчитывает не одно десятилетие, однако впервые в широкую клиническую практику данный вид местного лечения был внедрен советскими хирургами после положительных результатов его использования в ходе военных действий [87]. В 1999 году Давыдов Ю.А. и Ларичев А.Б. обобщили свой опыт применения отрицательного давления в терапии острых и хронических ран в монографии «Вакуум-терапия ран и раневой процесс» [4].

В 1997 году американские ученые Agenda и Morykwas обосновали теории эффективности вакуумной терапии [8]. В конце 1990х годов начинается производство первых коммерческих устройств для создания и поддержания отрицательного давления в раневой полости, получивших название Vacuum-Assisted Closure (VAC). Данная методика в настоящее время широко и успешно применяется в лечении острых и хронических ран различного генеза, хотя патофизиологические основы данного метода до конца не ясны.

Система для проведения терапии отрицательным давлением состоит из трех компонентов: создающего разрежение устройства с одноразовой канистрой и связанной с ней трубкой, стерильной полиуретановой губки или хлчатобумажной марли, подобранной под размер раны и герметизирующей

пленки [24;35]. Это обеспечивает удаление экссудата и прочие клеточные и внеклеточные эффекты.

В результате рандомизированных клинических испытаний было доказано, что на фоне вакуум-терапии раны при синдроме диабетической стопы заживали в 1.4 раза быстрее по сравнению со стандартным лечением и в 2.5 раза реже требовали проведения ампутаций [77].

Впервые возможные механизмы заживления ран на фоне вакуум-терапии были изучены Morykwas et al. в 1997 году. Позже другими авторами были сформулированы следующие клинические эффекты терапии отрицательным давлением [11;12;76; 93], а именно:

- Обеспечение влажной среды в ране и удаление избыточного экссудата
- Стимуляция заживления
- Сокращение размеров раны
- Усиление локальной гемодинамики
- Сокращение перираневого отека
- Стимуляция формирования качественной грануляционной ткани
- Уменьшение бактериальной обсемененности
- Деформация раневого ложа
- Усиление эффекта медикаментозной терапии

Многие исследования продемонстрировали положительное влияние отрицательного давления на локальную микрогемодинамику.

Так, в ходе изучения эффектов отрицательного давления на экспериментальных моделях, после применения давления в -125 мм.рт.ст. в течение 5-7 минут было отмечено максимальное усиление кровотока, оцененное с помощью дуплексного сканирования. Давление в -400 мм.рт.ст. приводило к

снижению кровотока. Использование аппарата в прерывистом режиме приводило к повторному усилению кровотока, однако данных о длительности этого эффекта нет [93]. Область усиленного кровотока была больше самой раны и располагалась в радиусе более 3,5 см от краев дефекта. Пятидесятипроцентное усиление кровотока сохранялось около 10 минут, после чего скорость кровотока становилась ниже исходного уровня. Был сделан вывод о целесообразности использования прерывистого режима VAC-терапии для улучшения кровоснабжения в ране [125;126].

В другой экспериментальной работе было зарегистрировано усиление кровотока, по результатам капилляроскопии, вследствие увеличения диаметра сосудов, скорости кровотока, а также, активирования неоангиогенеза и пролиферации эндотелия по данным морфологического исследования материала [40].

Timmers et al. провел аналогичное исследование на здоровых добровольцах, в котором было зафиксировано усиление кровотока в интактной коже предплечья в ответ на воздействие отрицательного давления различной величины (-25-500 мм рт.ст.). Максимальное увеличение кровотока возникало при давлении -300 мм рт.ст. Был сделан вывод о прямой зависимости степени и длительности гиперемии от величины отрицательного давления [27; 120]. Однако, не смотря на это, вопрос оптимальной величины отрицательного давления и режима его применения остается открытым.

Было доказано, что микродеформация клеток, которая достигается использованием отрицательного давления, провоцирует неоваскулогенез. Так, в исследовании Erba et al. при окрашивании биоптатов ран CD31 был отмечен выраженный прирост количества новообразованных сосудов. Полученные данные подтверждаются усилением экспрессии VEGF на фоне вакуум-терапии по сравнению со стандартным лечением. Применение отрицательного давления было ассоциировано с формированием микрососудистой сети в дне раневого дефекта. Это способствовало притоку кислорода и нутриентов к грануляционной

ткани, что ускоряло процесс заживления не только за счет запуска образования новых сосудов на фоне экспрессии VEGF, но и в результате стимулирующего действия механического растяжения тканей на пролиферацию клеток эндотелия [53].

Схожие данные получены и в исследовании Petersen et al., где механическое растяжение сухожилий стимулировало фибробласты к выработке VEGF [103].

В ходе эксперимента на лабораторных моделях было зафиксировано повышение экспрессии VEGF и фактора роста фибробластов (bFGF) в течение первых 5 дней терапии отрицательным давлением. Это исследование также демонстрирует, что экспрессия VEGF и bFGF в ранах заметно возрастала на фоне применения отрицательного давления в значениях от - 75 до 150 мм.рт.ст. Однако убедительных данных за наличие различий в выраженности экспрессии VEGF и bFGF в ранах на фоне терапии отрицательным давлением -300 мм.рт.ст. и местного применения губчатых повязок получено не было. Был сделан вывод об отсутствии влияния больших величин отрицательного давления на стимуляцию пролиферации тканей и кровеносных сосудов [70; 130; 134].

В эксперименте описан положительный результат применения VAC-терапии (-125 мм рт.ст.) на плохо кровоснабжаемых трансплантатах кожи (отношение длины к ширине – 1:4) [92]. В группе, получавшей вакуум-терапию, обнаружено значимое ускорение приживления трансплантатов, меньший объем вторичных некрозов по сравнению с группой контроля.

В одной из первых экспериментальных работ по изучению влияния различных режимов отрицательного давления на искусственно созданные раны у лабораторных животных было обнаружено ускорение формирования грануляционной ткани в случае применения VAC в прерывистом режиме (5 минут отрицательное давление включено, 2 минуты – отключено), по сравнению с постоянным отрицательным давлением [93].

В ходе одного из проведенных экспериментов изучались эффекты различных уровней отрицательного давления на заживление ран у лабораторных животных. Авторы выявили максимальное формирование грануляционной ткани и улучшение заживления ран при отрицательном давлении -125 мм рт.ст., в то время как другие его величины (-25 мм рт.ст. и -500 мм рт.ст.), наоборот, приводили к увеличению площади раневого дефекта [91].

В литературе имеется указание на значимое уменьшение площади раны у 50 лабораторных животных после 2х недель VAC- терапии, в том числе и при низких величинах отрицательного давления (50-125 мм рт.ст.), в сравнении с группой, не получавшей данный вид лечения или на фоне терапии отрицательным давлением – 25 мм рт.ст. [68].

Lavery et al. отметили выраженную корреляцию между сокращением ран на 15% в первую неделю применения отрицательного давления и уменьшением площади дефекта на 60% через 4 недели вакуум-терапии. У 43% обследованных больных зафиксировано сокращение размеров ран более, чем на 50% в первые 4 недели применения NPWT [77].

Вакуум-терапия потенциально может влиять на заживление ран, ингибируя протеазы, однако на сегодняшний день однозначных выводов о том, какой эффект доминирует при лечении отрицательным давлением (синтез цитокинов или ингибирование протеаз) нет [77].

В одной из работ выявлено снижение уровня металлопротеаз в экссудате хронических ран у 5 пациентов, получавших VAC-терапию [66]. Авторы заключили, что меньшая экспрессия MMP-1, MMP-13, MMP-2 является следствием применения VAC-терапии, что и приводило к лучшему заживлению раневых дефектов.

Некоторыми учеными снижение уровня MMP объясняется удалением их из раны с помощью системы вакуума[8].

Для достижения заживления раны крайне важно снизить бактериальную контаминацию. В настоящий момент дискуссионным остается вопрос о влиянии терапии отрицательным давлением на количество бактерий в дефекте. В некоторых исследованиях говорится о снижении бактериальной обсемененности раны после вакуум-терапии [57]. В ходе исследования Morykwas и соавт. было выявлено значимое снижение количества бактерий на 5 день эксперимента на искусственно созданной ране у лабораторных животных, в лечении которой применялась VAC-терапия в течение 2 недель, по отношению к группе сравнения, где раны обрабатывались физиологическим раствором. После 5 дня значимого уменьшения количества бактерий не наблюдалось [93].

Другие клинические исследования показали, что разница в количестве бактерий в ранах у больных на фоне терапии отрицательным давлением и стандартного лечения отсутствовала [26]. В работе Boone et al. было выявлено, что применение VAC способствовало снижению количества бактерий, хотя различные его величины никак не влияли на динамику их численности. Это результат позволяет предположить, что увеличение отрицательного значения давления не способствует очищению раны от инфекции [36].

В 2008 г. Всемирной организацией по изучению заживления ран и Международной группой экспертов были сформулированы и опубликованы рекомендации по применению VAC-терапии [8, 132].

1. В первую очередь следует обратить внимание на этиологию раны, а также сопутствующую патологию, что является основой для стабилизации физического, метаболического и психологического состояний пациента. Это позволит обеспечить индивидуальную адаптацию терапии, которая будет максимально эффективной.

2. Прежде, чем начать VAC-терапию, важно определить цели лечения, приоритеты и возможные клинические результаты. Надо постараться предотвратить отдаленные осложнения, тщательно контролировать симптоматику, что позволит сократить продолжительность лечения.

3. Основными целями вакуумной терапии являются:

- удаление экссудата и уменьшение перираневого отека;
- усиление микроциркуляции в мягких тканях;
- активизация формирования грануляционной ткани;
- уменьшение размеров и глубины раны;
- сокращение количества возможных осложнений и объема необходимого хирургического вмешательства.

VAC-терапия обеспечивает закрытую влажную среду раны, что служит барьером для бактерий и распространения инфекционного процесса. Данное техническое устройство повышает мобильность и комфорт пациента, уменьшает продолжительность его пребывания в стационаре.

Для принятия решения о проведении лечения отрицательным давлением необходима уверенность в чистоте раны, отсутствии некротических участков, а также большой глубины дефекта.

4. Важно регулярно проводить оценку динамики размера раны. Если скорость заживления составляет 15% за 1–2 недели, необходимо продолжать терапию. Повторная оценка раневого дефекта необходима после каждой последующей недели терапии. Если же улучшения состояния раны не отмечается, необходимо прервать вакуум-терапию для использования альтернативного метода воздействия на раневой дефект с возможным возвратом к VAC на другом этапе лечения.

5. Показателями эффективности лечения хронических ран являются:

- прекращение увеличения раны после начала вакуум-терапии. В противном случае следует прекратить вакуум-терапию;
- появление эпителия в краевой зоне дефекта;
- появление полноценных ярких сочных грануляций; темное раневое ложе указывает на неадекватную сосудистую трофику ткани. Грануляционная ткань должна увеличиваться на 3–5% за каждый день лечения.

6. Терапия отрицательным давлением не может использоваться в качестве монотерапии при наличии раневой инфекции, однако возможно включение данного метода в комплексную терапию инфицированной раны в сочетании с антибактериальной терапией, защитой краев раны, частой сменой повязок и использованием перфорированных антибактериальных покрытий. Необходим более частый контроль размеров дефекта, а также состояния дна, качества экссудата и т.д. Если инфекционный процесс развивается в процессе проведения VAC-терапии, ее необходимо прекратить и начать системную антибиотикотерапию.

На сегодняшний день одной из групп пациентов, которым показано проведение вакуум-терапии, являются больные с СДС. При этом необходимо учитывать клиническую форму данного синдрома.

VAC-терапия может быть противопоказана при наличии глубоких нейроишемических дефектов. У пациентов с ишемическими язвами проведение хирургической реваскуляризации является приоритетным по отношению к VAC.

Вакуум-терапия противопоказана при [4]:

- наличии необработанного гнойного очага, в том числе при флегмоне
- выраженной ишемии конечности
- неконтролируемом остеомиелитическом процессе
- неадекватно проведенной хирургической обработке раны с сохранением некротизированных тканей
- наличии некомпенсированных коагулопатий
- злокачественном новообразовании в ране
- аллергии на компоненты набора для вакуум-терапии

При VAC-терапии у больного с СДС необходимо помнить, что ее использование целесообразно только после полноценной хирургической обработки раневого дефекта, контроля инфекции путем назначения

системной антибактериальной терапии и коррекции имеющейся ишемии. Проведение терапии требует адекватной разгрузки пораженной конечности.

Таким образом, на основании литературных данных, можно сделать вывод об эффективности использования отрицательного давления в комплексной терапии хронических ран. Механизмы влияния данного метода лечения на различные звенья раневого процесса требуют дальнейшего изучения.

1.6. Влияние коллаген-содержащих повязок на заживление ран при сахарном диабете

Препараты на основе коллагена (Promogran, Suprasorb S, Collahit) – группа современных средств местного лечения трофических язв, в том числе и у больных сахарным диабетом. Данные перевязочные средства на 55% состоят из коллагена и на 45% из окисленной регенерированной целлюлозы [45;131]. Механизм их действия основан на способности коллагена (бычьего, свиного, человеческого), входящего в их состав, конкурировать с собственным коллагеном раны во взаимодействии с протеолитическими ферментами. Когда коллаген вступает во взаимодействие с жидкостью (раневым экссудатом), он абсорбирует его на себя и образует гель. Это свойство позволяет повязке принимать форму раны. Образованный гель связывает и инактивирует металлопротеазы и эластазы, присутствующие в ране, что обеспечивает выработку факторов роста, способствующих заживлению [45].

Коллаген является основным структурным белком в тканях животных и человека. На его долю приходится до 25% всех белковых структур организма, он присутствует в коже, костных структурах, связках, мышцах и сухожилиях [45]. При местном лечении ран наиболее часто используется коллаген 1 типа, выделенный из кожи или сухожилий животных. Он обеспечивает гемостаз, обладает низкой провоспалительной и антигенной активностью, позволяет формироваться новому коллагену, тем самым вызывая сокращение размеров раны, снижает активность ММР и способствует заживлению, уменьшает воспаление, стимулирует выработку ростовых факторов и пролиферацию клеток в области раны.

В исследованиях *in vitro* и в клинических испытаниях было доказано, что на фоне терапии коллаген-содержащими повязками снижается уровень провоспалительных цитокинов и протеаз.

Так, в исследовании Cullen et al. было показано, что коллаген-содержащая повязка Promogran эффективно связывается с MMP-9 и MMP-2 раневой среды, тем самым инактивируя их. Помимо этого результата, было описано также более эффективное связывание коллагена повязки с плазмином и эластазой раневого отделяемого по сравнению с другими перевязочными средствами, обеспечивающими влажную среду в ране [47].

Теми же учеными в другом эксперименте *in vitro* показано, что применение коллаген-содержащих повязок оказывало положительное влияние на культуру клеток, кроме того отмечено уменьшение экспрессии желатиназ на фоне применения данной терапии по сравнению с другими видами местного лечения [43].

Подобный эффект описан и другими исследователями при применении коллаген-содержащих повязок [44; 46; 82; 100; 107; 114].

Данное перевязочное средство способно связывать свободные радикалы, конечные продукты воспаления, эндотоксины и избыточные ионы железа и цинка, что косвенно обеспечивает уменьшение воспалительного процесса [47].

В частности, на экспериментальных моделях была показана способность компонентов одной из таких повязок (Promogran, Systagenix) связывать MMP в растворе [46]. Инкубация Promogran с экссудатом трофически язв больных диабетом дала аналогичный результат. Механизм этой реакции пока до конца не изучен, предполагается, что имеет место нековалентное взаимодействие. Исследование других эффектов повязки выявило ее ингибирующее влияние на плазминоген и эластазу.

В различных исследованиях доказано положительное влияние коллаген-содержащих повязок на процесс заживления хронических ран у пациентов с синдромом диабетической стопы. Так, в исследовании Veves et al. продемонстрировано полное закрытие раневых дефектов в течение 6 месяцев на фоне местного применения повязки Promogran [123].

В исследовании Lobmann et al. отмечено сокращение размеров раневых дефектов нижних конечностей на 16% по сравнению с группой контроля, где данный показатель составил 1.65% за 8 дней у лиц с сахарным диабетом, а также снижение уровня экспрессии MMP-9/TIMP2 по данным лабораторных исследований крови [82].

Схожие данные были получены в работе Страховой Г.Ю., где было показано, то местное применение коолаген-содержащей повязки Promogran приводило к снижению активности матриксных металлопротеаз и ускорению эпителизации раневых дефектов у больных с нейропатической формой СДС [15].

Интересно отметить исследование Kakagia, в котором было обнаружено, что применение повязки Promogran было более эффективно в отношении хронических ран при СД, чем аутологичных ростовых факторов. Однако, наилучшие результаты были зарегистрированы в группе, где применялась комбинация коллаген-содержащих повязок и факторов роста [74].

Несмотря на обилие литературных данных и клинических случаев, свидетельствующих об эффективности местного применения коллаген-содержащих повязок в лечении хронических ран при сахарном диабете, понимания молекулярных механизмов действия данного средства лечения до сих пор нет.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в дизайне открытого проспективного рандомизированного сравнительного исследования с параллельными группами, в которое были включены пациенты с сахарным диабетом и синдромом диабетической стопы, находившиеся на стационарном лечении в отделении диабетической стопы ФГБУ Эндокринологический научный центр (зав.отделением д.м.н., проф. Галстян Г.Р.) в период с сентября 2011 года по декабрь 2014 года. Пациенты были распределены по группам местного лечения методом случайной выборки.

2.1 Объект исследования

Было обследовано 63 пациента с сахарным диабетом 1 и 2 типов с нейропатической и нейро-ишемической формами синдрома диабетической стопы (без критической ишемии нижней конечности) в возрасте от 32 до 78 лет. Всем пациентам была проведена хирургическая обработка раневого дефекта нижней конечности (традиционная или гидрохирургической системой VersaJet, Smith&Nephew, Великобритания) с иссечением некротизированных тканей и санированием очага инфекции, после чего был произведен забор биоптата раневого дефекта для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования.

В качестве биопсийного материала брался участок ткани из центра раны, объемом около 0.5 см³.

После проведения хирургической обработки раны пациенты были распределены на группы методом случайной выборки.

Первую группу составили пациенты, получавшие в качестве местного лечения терапию отрицательным давлением величиной от -90 до -120 мм.рт.ст. (VivanoTec, Hartmann. Германия; Renasys, Renasys Go, Smith &Nephew.

Великобритания), смена губчатой повязки проводилась 1 раз в 3-4 дня в зависимости от локального статуса и выраженности экссудации.

Во вторую группу были включены пациенты, находившиеся на терапии коллаген-содержащими повязками Promogran (Systagenix, Великобритания), перевязка проводилась 1 раз в 2 дня, согласно рекомендациям по применению данного перевязочного средства.

В третью группу – контрольную – входили больные, получавшие стандартное лечение атравматическими повязками (Adaptic, Systagenix, Великобритания; Atrauman, Hartmann, Германия). Учитывая низкую впитывающую способность вышеперечисленных средств закрытия, в качестве вторичной повязки применялись такие повязки как Mesorb (Molnlycke Health Care, Швеция), Zetuvit (Hartmann, Германия). Смена повязки проводилась ежедневно.

Группы 1 и 2 между собой не сравнивались в связи с различными механизмами действия исследуемых методик (физический метод воздействия при вакуум-терапии и конкурентное взаимодействие бычьего коллагена, входящего в состав коллаген-содержащих повязок, с матриксными металлопротеазами раневой среды). Кроме того, согласно отечественным и международным рекомендациям по лечению СДС, терапия отрицательным давлением и коллагеном являются адъювантными методами лечения, в отличие от стандартного местного лечения атравматическими повязками [1; 69]. Таким образом, представляет интерес изучить эффективность вышеописанных методик местного лечения по сравнению со стандартной терапией.

Обследование включало в себя осмотр, анализ клинико-anamnestических данных, результатов лабораторно-инструментальных, а также гистологических и иммуногистохимических исследований.

Согласно принятым рекомендациям [1], в ходе пребывания в стационаре всем больным проводилась разгрузка нижних конечностей, по показаниям проводилась антибактериальная терапия. Антибактериальные препараты назначались с целью

профилактики вторичного инфицирования ран, которое возможно при смене повязок.

В ходе госпитализации у всех больных значения гликемии были в пределах целевых.

Всеми пациентами было подписано информированное согласие на проведение того или иного метода лечения.

Протокол исследования одобрен на заседании этического комитета ФГБУ ЭНЦ от 28 ноября 2012 года (протокол №18).

Критерии включения:

1. Пациенты с сахарным диабетом 1 и 2 типа.
2. Возраст от 20 до 80 лет.
3. $HbA1c < 12\%$.
4. Наличие хронического раневого дефекта стопы II - III ст. по Wagner на фоне нейропатической или нейро-ишемической (без критической ишемии) формы синдрома диабетической стопы.
5. $TspO_2 > 25$ мм.рт.ст.
6. Отсутствие активной раневой инфекции и/или остеомиелита на момент начала местной терапии

Критерии невключения:

1. Пациенты с хроническими раневыми дефектами стоп без нарушений углеводного обмена.
2. Возраст < 20 и > 80 лет.
3. $HbA1c > 12\%$.
4. Наличие критической ишемии конечности (клинически и при $TspO_2 < 25$ мм.рт. ст.)
5. Наличие активной раневой инфекции и/или остеомиелита на момент начала местного лечения

6. Раневые дефекты 0, I и IV степени по Wagner
7. Острое нарушение мозгового кровообращения и острый коронарный синдром в течение последнего месяца
8. Беременность

2.2 Методы исследования

В соответствии с поставленными задачами, пациентам проводились следующие клинические исследования:

1. Общеклиническое обследование (с оценкой жалоб, анамнеза, особенности течения основного заболевания и наличия и степени тяжести сопутствующих заболеваний)
2. Осмотр нижних конечностей, оценка состояния кожных покровов и ногтей, наличия отеков, оценка периферической чувствительности, оценка степени раневого дефекта по Wagner, а также измерение площади и глубины раневого дефекта до, во время и после лечения.
3. Оценка состояния периферического кровотока (ультразвуковое дуплексное сканирование артерий и вен, транскутанное напряжение кислорода тканей). Исследования проведены на базе отделения диабетической стопы ФГБУ ЭНЦ
4. Оценка выраженности болевого синдрома проводилась с помощью пятибалльной вербальной шкалы оценки боли (Ohnhaus E. E., Adler R., 1975) до и после лечения
5. Общеклинический анализ крови, биохимический анализ крови. Оценка состояния углеводного обмена (по гликированному гемоглобину, липидному профилю).
6. Определение наличия и степени выраженности микрососудистых осложнений сахарного диабета (МАУ, протеинурия, подсчет СКФ, исследование глазного дна – прямая офтальмоскопия)

7. Забор биоптатов раневых дефектов до и после лечения
8. Световая микроскопия биоптатов ран до и после лечения
9. Иммуногистохимическое исследование биоптатов раневых дефектов до и после лечения с определением маркеров репарации

2.2.1 Лабораторные методы исследования

Общеклинический анализ крови проводился на гематологическом анализаторе ХЕ 2100 (Sysmex, Япония) с автоматической загрузкой образцов. Биохимический анализ крови производился на автоматическом биохимическом анализаторе Architect plus C 4000 (Abbott Diagnostics, США) фотометрическим методом по стандартным методикам с использованием реактивов производителя. Уровень гликированного гемоглобина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления на аппарате D-10 (BioRad Laboratories, США) по стандартной методике производителя.

Диагностика диабетической нефропатии проводилась согласно Алгоритмам специализированной медицинской помощи больным СД [1]. Определение микроальбуминурии (МАУ) в утренней порции мочи, протеинурии в суточной моче проведено на автоматическом биохимическом анализаторе Architect 4000 (Abbott, США) иммунным турбодиаметрическим методом по стандартным методикам с использованием реагентов Abbott Diagnostics, США.

В биохимическом анализе крови оценивался липидный профиль (холестерин общий, липопротеиды низкой и высокой плотности, триглицериды), содержание креатинина, мочевины, электролитов, общего белка крови.

Подсчет скорости клубочковой фильтрации (СКФ) проводился по формуле MDRD (Modification of Dietin Renal Disease Study Group):

$$\text{СКФ (мл/мин/1.73 м}^2\text{)} = 186 \times (\text{уровень креатинина плазмы})^{-1.154} \times (\text{возраст [годы]})^{-0.203} \times 0.742 \text{ (для женщин)}.$$

Все лабораторные исследования образцов крови проводились по стандартным методикам на базе клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ России (зав.отделением – Ильин А.В.).

2.2.2 Инструментальные методы исследования

Тактильная чувствительность оценивали с помощью монофиламента массой 10 г (North Coast Medical Inc., США) по стандартной методике. Вибрационную чувствительность определяли с помощью градуированного камертона (128 Гц) (Kircher&Wilhelm, Германия) на бугре большеберцовой кости, медиальной лодыжке и на латеральной поверхности головки 1-й плюсневой кости. Состояние температурной чувствительности определяли с помощью прибора «Тип-Терм» («Neue Medizintechnik GmbH», Германия).

Площадь раны определялась планиметрическим методом путем очерчивания контуров раны через прозрачную масштабную пленку (Opsite Flexgrid, Smith and Nephew, Великобритания) с последующим подсчетом количества квадратных сантиметров внутри контура. Глубина раневого дефекта оценивалась с помощью стерильной линейки.

Кровоток по тыльным артериям стопы, передним и задним большеберцовым артериям, а также состояние венозного оттока оценивалось по результатам дуплексного сканирования на аппарате Voluson 730 («General Electric», США) на базе отделения диабетической стопы ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ (к.м.н. Бондаренко О.Н., к.м.н. Егорова Д.Н.).

Определение транскутанного напряжения кислорода кожи околораневой зоны (tcpO_2) проводили методом транскутанной оксиметрии. Для измерения tcpO_2 использовали оксиметр «ТСМ-30» (Radiometer, Дания). Датчик устанавливали на

участок кожи на расстройнии 0.5-1.0 см от края раневого дефекта. Пациент в ходе исследования находился в положении лежа на спине в спокойном состоянии. Температура в помещении, где проводилось определение $t_{cp}O_2$, составляла 21–23°C. До начала обследования электроды калибровались атмосферным воздухом. После обработки кожи спиртовым раствором на нее устанавливались фиксирующие кольца, полость которых заполнялась раствором электролита. Затем в фиксирующие кольца помещались электроды. В течение нескольких минут датчик нагревал участок кожи в месте наложения до 43 °C. Регистрация показателей транскутанной оксиметрии проводилась при их стабилизации через 10-15 минут после начала исследования.

Оценка выраженности болевого синдрома проводилась с помощью 5-балльной вербальной шкалы оценки боли (Frank A. J. M., Moll J. M. H., Hort J. F., 1982). Пациента опрашивали до и после лечения, испытывает ли он какую-либо боль, после чего было предложено оценить свои болевые ощущения по 5-балльной шкале, где 0 - нет боли, 1 - слабая боль, 2 - умеренная боль, 3 - сильная боль; 4 - очень сильная боль.

Офтальмологическое обследование больных СД состояло из сбора анамнеза; осмотра век, определения подвижности глазного яблока; визометрии по таблицам Сивцева-Головина, обследования полей зрения на электросферопериметре (Zeiss, Германия), пальпаторного определения офтальмотонуса; тонометрии с помощью бесконтактного тонометра ТГДц-01 (Пра), офтальмобиомикроскопии переднего отрезка глаза с помощью стационарной щелевой лампы, прямой и обратной офтальмоскопии при помощи прямого и бинокулярного налобного офтальмоскопов фирмы Welch Allyn, США. Результаты фиксировали путем фотографирования глазного дна на семипольной фундус-камере FF-5 (Opton, Германия), оснащенной фотоаппаратом Nikon, Япония. Исследования проводились на базе отделения диабетической ретинопатии и офтальмохирургии ФГБУ ЭНЦ МЗ России (Зав. отделением д.м.н. Липатов Д. В.).

2.2.3 Морфологическое исследование

Морфологические исследования проведены на базе лаборатории гистологии и иммуногистохимии с группой криобанкинга ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ (зав.отделением д.м.н., проф. Абросимов А.Ю.)

Морфологический анализ операционного материала включал гистологический и иммуногистохимический методы исследования.

Биопсийный материал фиксировали в 10% растворе формалина, затем заливали в парафин по стандартной методике. Серийные срезы толщиной 3 мкм депарафинировали по стандартной схеме и окрашивали гематоксилином и эозином.

Оценка выраженности отека и экстрацеллюлярного матрикса проводились полуколичественным методом с помощью балльной оценки, где 1 «+» – слабо выражено, 2«+» – умеренно выражено, 3 «+» – сильно выражено, 4 «+» – очень сильной выражено [71].

Зрелость грануляционной ткани оценивалась посредством определения площади некроза, количества сосудов, выраженности воспалительного инфильтрата и клеточного состава (полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты, макрофаги, фибробласты), и разделялась на молодую, созревающую, зрелую (по Струкову А.И, Серову В.В, 2010) [16], где 1 – молодая грануляционная ткань: богатая клетками и тонкостенными сосудами соединительная ткань, между сосудами много недифференцированных лимфоцитоподобных клеток соединительной ткани, лейкоцитов, плазматических клеток и лаброцитов, 2 – созревающая грануляционная ткань: продолжается дифференцировка клеточных элементов, волокнистых структур, а также сосудов. Число гематогенных элементов уменьшается, а фибробластов - увеличивается. В связи с синтезом фибробластами коллагена в межклеточных пространствах образуются аргирофильные, а затем и коллагеновые волокна. По мере созревания фибробластов количество

коллагеновых волокон увеличивается, они группируются в пучки; 3 – зрелая грануляционная ткань: волокнистая соединительная ткань.

Фазы воспаления были определены на основании классификации Кузина М.И. (1990 года), где фаза 1 – воспаления: в ране преобладают нейтрофильные гранулоциты, моноциты и макрофаги, фаза 2 - регенерации и созревания грануляционной ткани: последняя формируется в виде отдельных очагов на дне раны и характеризуется интенсивным новообразованием капилляров. Определяется большое количество фибробластов, формирование коллагеновых и эластиновых волокон, фаза 3 - рубцевания и эпителизации: грануляционная ткань превращается в зрелую фиброзную ткань с грубыми коллагеновыми волокнами и фиброцитами.

Гистологическое исследование биопсийного материала проведено двумя независимыми морфологами на базе лаборатории гистологии и иммуногистохимии с группой криобанкинга ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ и кафедры патологической анатомии ПМГМУ им. И.М.Сеченова (зав.кафедрой - академик РАМН Пауков В.С.)

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполнили на иммуноштейнере Leica BOND-MAX (Германия). Характеристика использованных антител приведена в таблице 1. Использовались антитела к тканевому ингибитору металлопротеиназы 1 (TIMP-1), к матриксной металлопротеазе – 9 (MMP-9), антителу CD68 (белок семейства лизосомальных гликопротеинов, экспрессирующийся макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, базофилами и НК- клетками), молекуле адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов -1 CD31 и белку остеопонтину.

Таблица 1. Характеристика антител

| <i>Антитело</i> | <i>Характеристика антител</i> | <i>Фирма производитель</i> | <i>разведение</i> | <i>Положительный контроль</i> |
|-----------------|---|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| TIMP-1 | Мышиное/моноклональное (клон VT7) | Dako, США | 1:50 | Мозговой слой надпочечника |
| ММР-9 | Кроличье/поликлональное (клон ММР-9) | Dako, США | 1:100 | Толстая кишка |
| Остеопонтин | Кроличье/моноклональное (клон EP106) | Epitomics, США | 1:100-1:200 | |
| CD31 | Мышиное/моноклональное (клон JC70A) | Dako, США | 1:30 | аппендикс |
| CD68 | Мышиное/моноклональное (клон PG-M1) | Dako, США | 1:100 | миндалины |

Оценка экспрессии маркеров.

Оценка экспрессии таких цитоплазматических маркеров, как TIMP-1, ММР-9, остеопонтина проводилась полуколичественным методом: 1«+» окрашивание единичных клеток (менее 30% клеток), 2«+» - 30-60% клеток , 3«+» - 60-90% , 4 «+» - более 90% клеток.

Степень экспрессии CD68 (маркер макрофагов миелоидных и гистиоцитарных клеток) была рассчитана полуколичественным методом исходя из числа иммунопозитивных клеток и варьировала в диапазонах: 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-30%, 30-40% специфически окрашенных клеток.

Плотность сосудов на единицу площади ($0,75\text{мм}^2$ (увеличение 20х, диаметр поля зрения объектива 1 мм)) оценивали путем подсчета количества сосудов, эндотелий которых экспрессировал CD31, в месте их наибольшей плотности.

Морфологам не сообщали метод проводимого местного лечения у обследуемых больных, таким образом, гистологическое и иммуногистохимическое исследование были заслепленными.

Микрофотографии выполнены с помощью камеры Leica DSC 450 S («Leica», Германия).

2.3. Статистические методы анализа данных

Статистическая обработка полученных данных была проведена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA (StatSoft Inc. США, версия 6.0). Для анализа вида распределений применялись критерии Шапиро-Уилка и Лиллиефорса, дисперсии распределений признаков оценивались с помощью F-критерия в процедуре дисперсионного анализа ANOVA. Учитывая небольшие объемы выборок и распределения отличающиеся от нормального, были использованы непараметрические методы анализа данных. Сравнение независимых групп по количественным признакам осуществлялось непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Сравнение зависимых групп по количественным признакам осуществлялось непараметрическим методом с использованием критерия Вилкоксона. Сравнение независимых групп по качественным признакам осуществлялось непараметрическим методом путем анализа таблиц сопряженности с использованием двухстороннего точного критерия Фишера для несвязанных групп. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Анализ связи (корреляции) двух количественных признаков осуществлялся непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену. Результаты исследований, обработанные статистически и представленные в виде таблиц или диаграмм, дают возможность судить о динамике медианы параметра, достоверности и интерквартильном отрезке, а так же связи с изменениями других параметров в соответствии с современными требованиями.

Глава 3. Результаты

3.1. Характеристика обследованных больных до начала местного лечения

ран

Комплексное обследование было проведено 63 пациентам с сахарным диабетом и СДС от 32 до 78 лет, находившихся на стационарном лечении в отделении диабетической стопы в ФГБУ Эндокринологический центр МЗ РФ в период с сентября 2012 года по декабрь 2014 года.

Пациенты всех групп были сопоставимы по возрасту, контролю углеводного обмена, выраженности микрососудистых осложнений, состоянию артериального кровотока нижних конечностей, площади и глубине раневых дефектов, а также выраженности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей по данным световой микроскопии и иммуногистохимического анализа ($p > 0.05$).

3.1.1. Клиническая характеристика

В таблице 2 представлена подробная общая характеристика больных до начала местного лечения, распределенных в группу вакуум-терапии (группа 1), коллаген-содержащих повязок (группа 2) и контрольную группу (группа 3).

Таблица 2. Характеристика обследованных больных до начала местного лечения ран.

| Показатель | Группа 1 NPWT (n=21) | Группа 2 коллаген (n=21) | Группа 3 контроль (n=21) | p-value* | p-value** |
|--|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------|-----------|
| Возраст, Ме [Q25;Q75], лет | 60[52;64] | 55[50;66] | 60[57;72] | 0,26 | 0,16 |
| Пол (М/Ж) | 14/7 | 14/7 | 14/7 | 1,0 | 1,0 |
| Длительность течения СД, Ме [Q25;Q75], лет | 16[12;24] | 15[13;16] | 12[9;16] | 0,039 | 0,19 |
| Тип сахарного диабета (1/2) | 5/16 | 5/16 | 1/20 | 0,73 | 0,18 |
| HbA1c, Ме [Q25;Q75],% | 8,8[7,4;10,6] | 8,3[7,8;9,5] | 8,8[7,6;9,7] | 0,83 | 0,63 |

p* - группа 1-3

p** - группа 2-3

Как видно в таблицы 2, пациенты, распределенные в ту или иную группу, были сопоставимы по полу, возрасту и состоянию углеводного обмена.

Обследованные пациенты были преимущественно мужского пола. Пациенты группы 1 имели большую длительность сахарного диабета.

Средний возраст больных составлял 58 ± 11 лет.

Большинство пациентов, распределенных в различные группы периоперационного лечения, страдали сахарным диабетом 2 типа.

У пациентов с СД 1 типа средняя длительность заболевания составляла $21 \pm 6,8$ лет, у лиц с СД 2 типа - $14 \pm 6,5$ лет.

Среднее значение гликированного гемоглобина (HbA1c) у всех обследованных составляло $8,85 \pm 1,68\%$, что свидетельствует о неудовлетворительном контроле заболевания.

3.1.2. Микрососудистые осложнения сахарного диабета у обследованных больных

У всех пациентов, включенных в исследование, проводилась оценка выраженности микрососудистых осложнений СД: диабетической полинейропатии, диабетической нефропатии и диабетической ретинопатии.

Подробные данные об их выраженности в группах больных представлены в таблице 3.

Таблица 3. Выраженность микрососудистых осложнений у обследованных больных.

| Микрососудистые осложнения СД | Группа 1 NPWT | Группа 2 коллаген | Группа 3 контроль | p-value* | p-value** |
|--|------------------|----------------------|----------------------|----------|-----------|
| Диабетическая нейропатия (n): | | | | | |
| Нет | 1 | 2 | 0 | 1,0 | 0,49 |
| Есть | 20 | 19 | 21 | | |
| Диабетическая нефропатия (n): | | | | | |
| Нет | 6 | 5 | 8 | 0,74 | 0,50 |
| На стадии микроальбуминурии (МАУ) | 8 | 10 | 6 | 0,74 | 0,34 |
| На стадии протеинурии (ПУ) | 5 | 3 | 4 | 1,0 | 0,70 |
| Терминальная стадия хронической почечной недостаточности (ХПН) | 2 | 3 | 3 | 1,0 | 1,0 |
| Диабетическая ретинопатия (n): | | | | | |
| Нет | 5 | 6 | 1 | 0,18 | 0,09 |
| Непролиферативная | 7 | 8 | 15 | 0,029 | 0,06 |
| Препролиферативная | 2 | 1 | 3 | 1,0 | 0,60 |
| Пролиферативная | 7 | 6 | 2 | 0,13 | 0,24 |

p* - группа 1-3, p** - группа 2-3

Судя по представленным в таблице 3 данным, группы статистически не различались по выраженности микрососудистых осложнений сахарного диабета. Практически у всех больных имелась дистальная диабетическая полинейропатия. Согласно представленным данным, у 3 пациентов отсутствовали ярко выраженные проявления нейропатии по результатам оценки периферической чувствительности. Однако, наличие у них сухости кожи и гиперкератозов стоп, а также нарушения работы потовых желез, позволило расценить вышеуказанные симптомы как начальные проявления нарушения периферической иннервации. Группы незначительно различались по наличию непролиферативной ретинопатии.

3.1.3. Результаты лабораторных показателей крови обследованных больных

В таблице 4 представлены результаты лабораторных исследований крови пациентов до начала местного лечения.

У обследованных больных отсутствовали признаки острого воспалительного процесса: значения лейкоцитов крови соответствовали нормальным. Не подтверждено наличие анемии и гипопротеинемии у обследованных лиц: показатели гемоглобина и общего белка крови в пределах референсных для каждой категории больных.

У всех больных медиана СКФ (MDRD) (Me[Q25;Q75]) была равна 85 [62;102], что соответствует 2 стадии хронической почечной болезни на фоне диабетической нефропатии.

Таким образом, данные факторы исключены в качестве причин замедленного заживления ран нижних конечностей у пациентов трех групп.

Таблица 4. Лабораторные показатели крови у больных обследованных групп больных.

| Показатель | Группа 1 NPWT | Группа 2 коллаген | Группа 3 контроль | p- value* | p- value ** |
|---|------------------|----------------------|----------------------|--------------|-------------------|
| Лейкоциты, Ме [Q25;Q75], 10*9/л | 8,58[6,63;10,09] | 6,89[5,80;8,55] | 8,23[7,00;10,74] | 0,90 | 0,10 |
| Гемоглобин, Ме [Q25;Q75], г/л | 121[113;134] | 124[116;134] | 120[110;126] | 0,62 | 0,13 |
| СОЭ, Ме [Q25;Q75], мм/час | 57[43;67] | 53[40;67] | 71[37;87] | 0,09 | 0,10 |
| Белок общ., Ме [Q25;Q75], г/л | 73[71;76] | 73[70;75] | 69,6[61,5;74,5] | 0,08 | 0,09 |
| СКФ(MDRD), Ме [Q25;Q75], мл/мин/1.73м2 | 81[62;95] | 84[55;98] | 94[75;106] | 0,26 | 0,17 |
| Холестерин общий, Ме [Q25;Q75], ммоль/л | 4,04[3,21;4,46] | 4,76[4,39;5,60] | 3,99[3,20;5,17] | 0,68 | 0,04 |
| ЛПВП, Ме [Q25;Q75], ммоль/л | 0,78[0,67;1,13] | 1,01[0,79;1,29] | 0,73[0,63;0,79] | 0,22 | 0,002 |
| ЛПНП, Ме [Q25;Q75],ммоль/л | 1,93[1,61;2,60] | 3,00 [2,45;3,67] | 2,32[1,84;3,05] | 0,28 | 0,02 |
| Триглицериды, Ме [Q25;Q75],ммоль/л | 1,53[1,20;2,15] | 1,65[1,00;2,23] | 1,50[1,21;2,12] | 0,89 | 0,79 |

p* - группа 1-3

p** - группа 2-3

3.1.4. Сопутствующие заболевания у лиц, включенных в исследование

В ходе обследования у всех больных определялось наличие сопутствующей патологии: ишемической болезни сердца (ИБС), постинфарктный кардиосклероз (ПИКС), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) в анамнезе, хроническая венозная недостаточность (ХВН). В графике 1 представлена структура сопутствующих заболеваний у обследуемых групп.

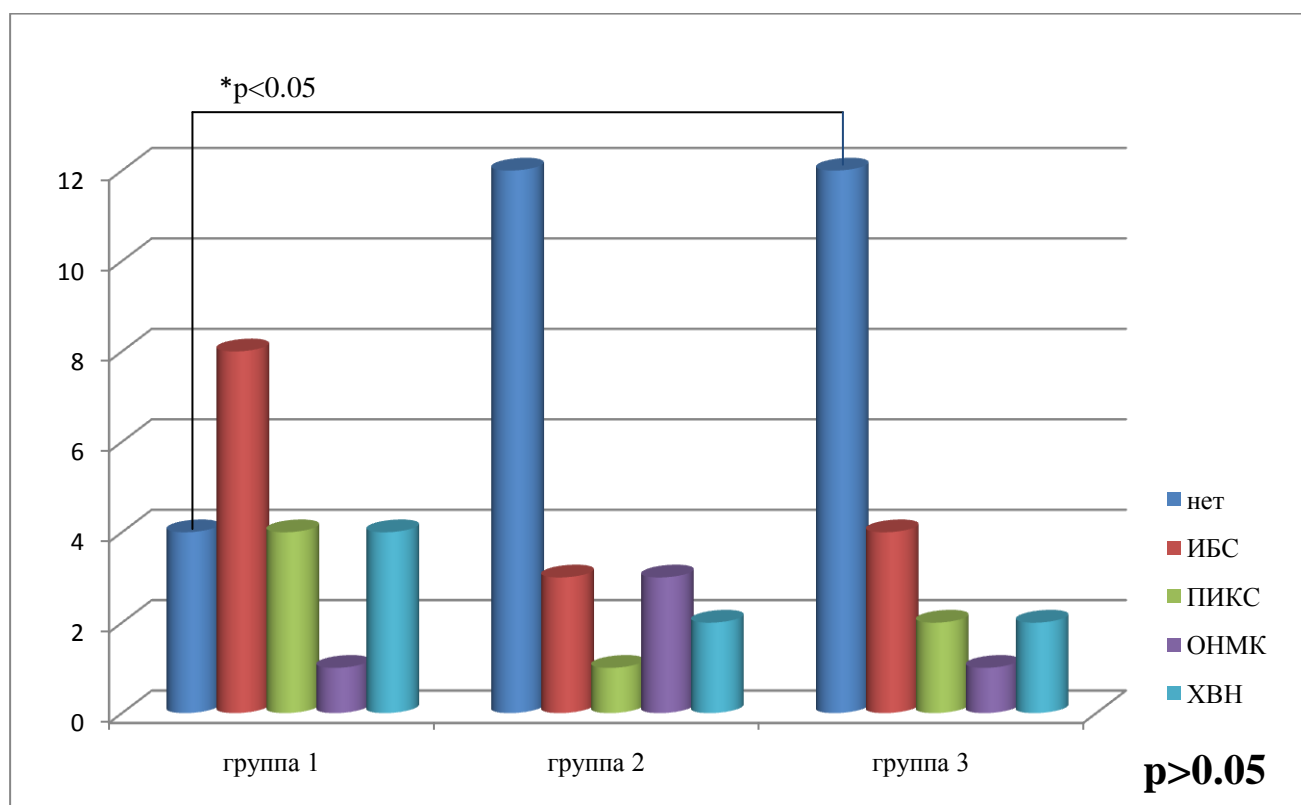


Рисунок 1. Структура сопутствующей патологии у обследованных больных

Таким образом, изученные группы пациентов были достоверно сопоставимы по наличию и характеру сопутствующих заболеваний. У большинства пациентов 1й группы имелась ишемическая болезнь сердца, однако по данному признаку группы статистически не различаются ($p>0.05$).

В группе 1 у меньшего количества больных отсутствовали сопутствующие заболевания ($p<0.05$).

3.1.5. Состояние микроциркуляторного русла у пациентов до начала терапии

Одним из ведущих факторов успешного заживления ран при сахарном диабете является достаточное обеспечение тканей кислородом. Учитывая то, что критерием исключения было наличие критической ишемии нижней конечности, у всех обследованных пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы определялся состоятельный кровоток в артериях этой области по данным доплерометрии и транскутанной оксиметрии, признаков критической ишемии пораженной конечности выявлено не было. Показатели транскутанного напряжения кислорода в тканях представлены на рисунке 2.

Статистических различий между группами выявлено не было.

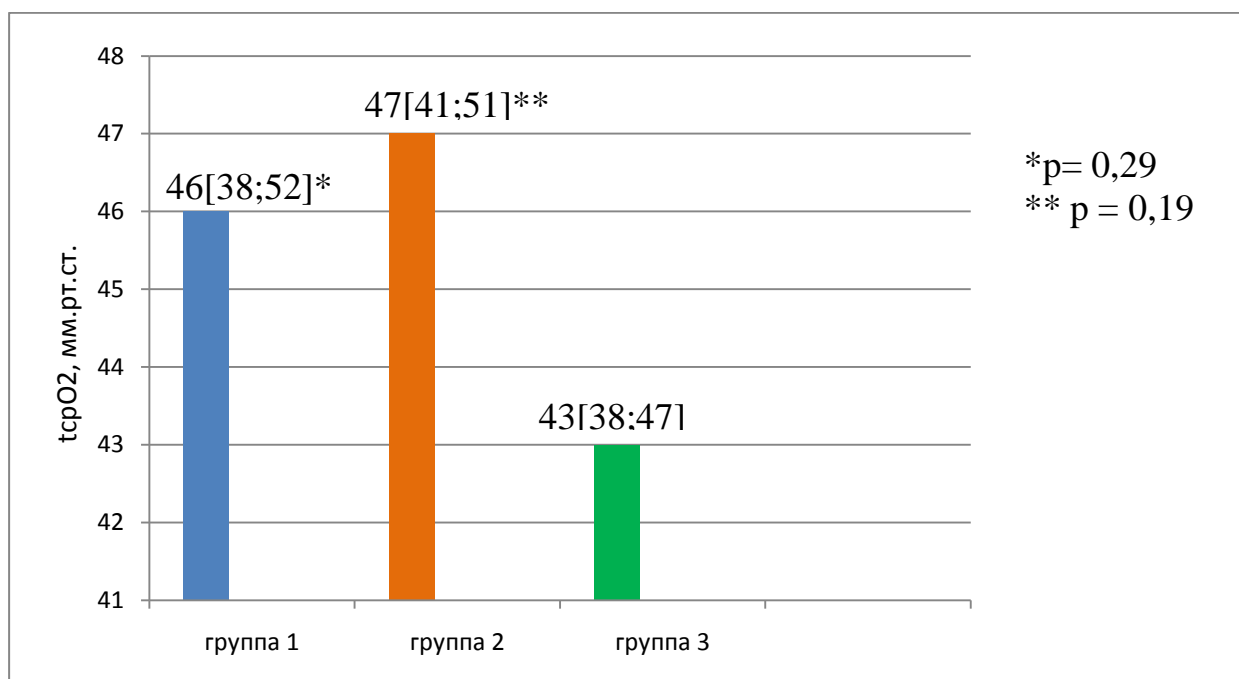


Рисунок 2. Значения транскутанного напряжения кислорода в группах обследованных больных до начала терапии.

3.1.6. Состояние раневых дефектов в исследуемых группах до начала терапии

Помимо общеклинического обследования, до начала терапии пациентам проводилась оценка состояния раневых дефектов.

В таблице 5 представлены подробная характеристика состояния ран до лечения в обследуемых группах.

Таблица 5. Клинические особенности состояния раневых дефектов до лечения у обследованных пациентов.

| Характеристика состояния ран | Группа 1 NPWT | Группа 2 коллаген | Группа 3 контроль | p-value* | p-value** |
|--|------------------|----------------------|----------------------|----------|-----------|
| Форма СДС | | | | | |
| нейропатическая | 11 | 13 | 6 | 0,21 | 0,06 |
| нейроишемическая | 10 | 8 | 15 | | |
| Выраженность болевого синдрома до лечения, Ме [Q25;Q75], баллы | 2[1;3] | 2[2;3] | 3[2;4] | 0,26 | 0,23 |
| Wagner (степень), Ме [Q25;Q75], | 2[2;3] | 2[2;3] | 3[2;3] | 0,15 | 0,29 |
| Площадь раны до лечения, Ме [Q25;Q75], см ² | 25,0[16,2;44,5] | 18,6[15,3;22,8] | 23,5[12,3;55,3] | 0,71 | 0,22 |
| Глубина раны до лечения, Ме [Q25;Q75], см | 3,3[1,5;6,5] | 2,8[2,2;3,2] | 3,2[2,4;5,2] | 0,89 | 0,19 |
| Реваскуляризация в анамнезе, количество пациентов | 8 | 6 | 9 | 0,5 | 0,7 |

p* - группа 1-3

p** - группа 2-3

Как видно из представленной выше таблицы, пациенты в трех группах статистически не различались по формам поражения, выраженности болевого синдрома, площади, глубине и стадиям раневого процесса.

Большинство пациентов имели нейроишемическую форму синдрома диабетической стопы.

При оценке болевого синдрома было определено, что его выраженность в баллах варьировала от умеренного до сильного. При необходимости, больные получали обезболивающие препараты (нестероидные противовоспалительные средства в стандартных дозировках).

Учитывая, что всем больным до начала терапии была проведена хирургическая обработка раневых дефектов, наличие инфекции и некрозов в ране исключено.

Согласно классификации Wagner, глубина раневых дефектов могла достигать костной ткани, однако наличие гангрены, остеомиелита и вторичных некрозов являлось критерием исключения из исследования.

Раневые дефекты были достаточно обширными и глубокими после проведенной хирургической обработки, что требовало дополнительных методов местного лечения в периоперационном периоде.

Согласно данным анамнеза, пациенты трех групп также не различались по количеству проведенных ранее реваскуляризаций.

На момент включения в исследование у всех больных наличие критической ишемии нижней конечности не подтверждено.

Глава 3.2. Морфологические особенности течения раневого процесса у лиц с синдромом диабетической стопы до лечения

Всем пациентам после проведенной хирургической обработки и до начала местной терапии проводился забор биоптатов из дна раневых дефектов с последующим проведением гистологического и иммуногистохимического исследования.

При анализе полученных результатов до начала местного лечения, установлено, что группы были сопоставимы по выраженности репаративных процессов в мягких тканях.

3.2.1. Гистологическая характеристика раневых дефектов до лечения

В ранах обследованных групп отмечался выраженный отек, плохо организованный экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ), низкое содержание фибробластоподобных клеток и выраженная воспалительная инфильтрация, выявлено наличие молодой грануляционной ткани ($p > 0.05$).

Несмотря на то, что у многих больных течение раневого процесса было длительным и порой резистентным к местному лечению, проведенная хирургическая обработка позволила перевести хронический процесс в острый.

По данным корреляционного анализа во всех группах выявлена средняя корреляционная зависимость между выраженностью отека и фазой раневого процесса. Так, чем выше была выраженность отека по данным гистологического исследования, тем выраженность воспаления, количество фибробластоподобных клеток и качество грануляционной ткани было ниже: коэффициент корреляции $r_s = -0.32$. аналогичная зависимость выявлена между выраженностью ЭЦМ и фазой раневого процесса – $r_s = -0.31$.

У большинства обследованных пациентов раны находились в фазе воспаления. Подробное описание морфологической картины биоптатов ран до лечения представлены в таблице 6.

Таблица 6. Гистологическая характеристика обследованных групп до начала местного лечения.

| Гистологическая характеристика | Группа 1 NPWT | Группа 2 коллаген | Группа 3 контроль | p-value* | p-value** |
|---|------------------|----------------------|----------------------|----------|-----------|
| Фаза раневого процесса, Ме [Q25;Q75] | 1[1;1] | 1[1;2] | 1[1;2] | 0,57 | 0,92 |
| Выраженность отека, медиана Ме [Q25;Q75] | 3[3;4] | 3[3;4] | 4[3;4] | 0,95 | 0,59 |
| Выраженность ЭЦМ, Ме [Q25;Q75] | 2[1;2] | 1[1;2] | 2[1;2] | 0,85 | 0,34 |
| Зрелость грануляционной ткани, Ме [Q25;Q75] | 1[1;2] | 1[1;2] | 1[1;1] | 0,77 | 0,34 |

p* - группа 1-3

p** - группа 2-3

Таким образом, можно предположить, что длительное течение сахарного диабета, отсутствие должного гликемического контроля негативно влияет на процессы заживления дефектов мягких тканей нижних конечностей, что выражается в наличии межклеточного отека, плохо организованного экстрацеллюлярного матрикса, низкого содержания фибробластоподобных клеток и выраженной воспалительная инфильтрация по данным гистологического исследования.

На рисунке 3 представлена типичная гистологическая картина биоптата раневого дефекта до начала местного лечения.

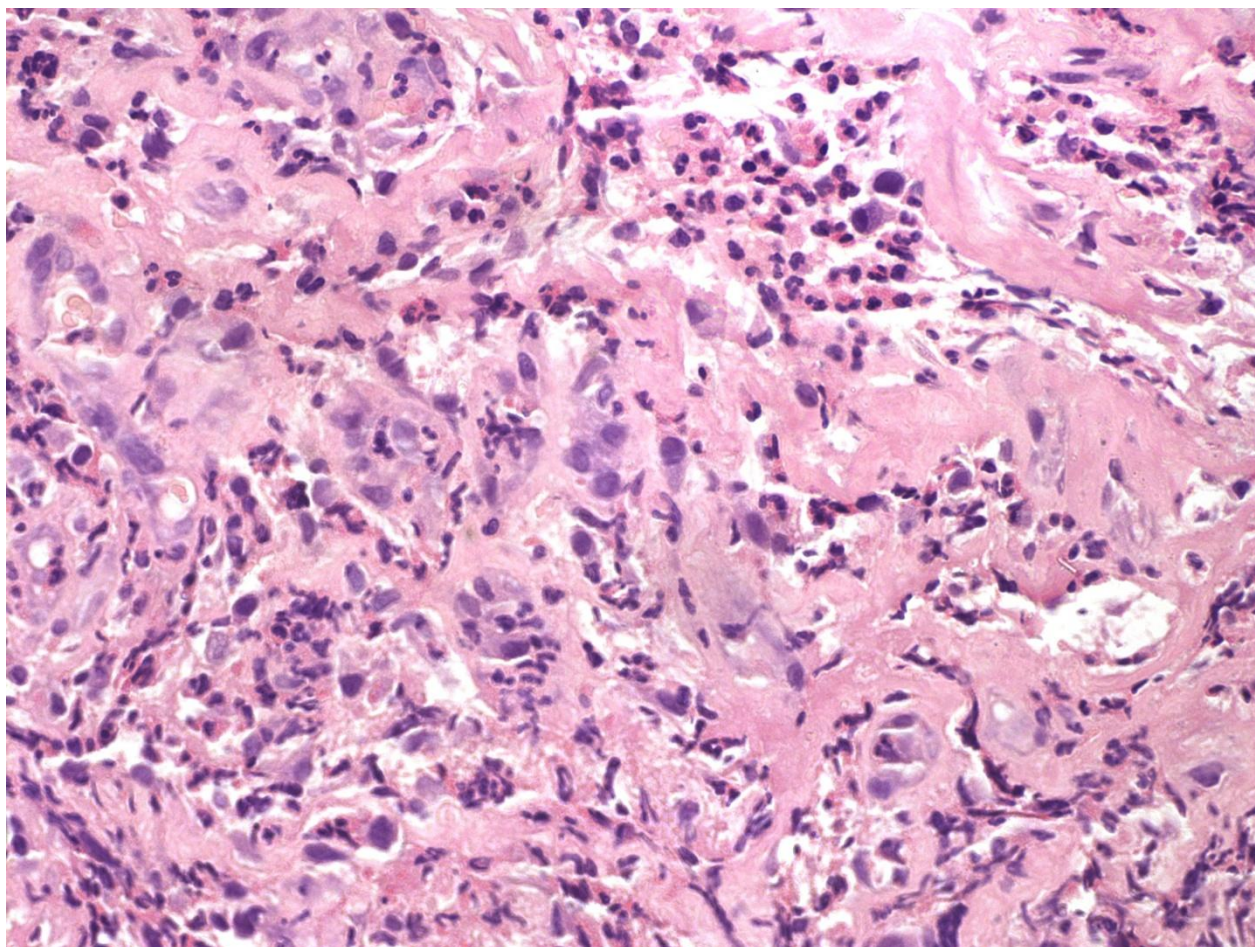


Рисунок 3. Типичная гистологическая картина биоптата раневого дефекта до лечения (гематоксилин-эозин, х400).

Фаза воспаления. Поверхностный лейкоцитарно-некротический слой, состоящий преимущественно из лейкоцитов, лимфоидных элементов разной степени зрелости. Выраженный межклеточный отек. Формирующая грануляционная ткань.

3.2.2. Иммуногистохимические особенности течения раневого процесса у лиц с синдромом диабетической стопы до лечения

По результатам иммуногистохимического (ИГХ) исследования во всех группах исходно отмечалось умеренное количество макрофагов (иммунопозитивных с антителами к CD68), и интенсивная окраска матриксной металлопротеазы-9, слабое окрашивание TIMP-1 и остеопонтина ($p > 0.05$).

Медиана количества сосудов, определенных с помощью ИГХ с АТ к CD31, до начала лечения представлены в таблице 7, статистически значимых различий между группами выявлено не было.

Таблица 7. Интенсивность репаративных процессов по данным ИГХ до начала терапии.

| Маркер репарации | Группа 1 NPWT | Группа 2 коллаген | Группа 3 контроль | p-value* | p-value** |
|---|---------------|-------------------|-------------------|----------|-----------|
| Количество сосудов при окрашивании АТ к CD 31, Me[Q25;Q75] | 46[33;66] | 43[19;62] | 58[30;95] | 0,31 | 0,15 |
| Количество макрофагов при окрашивании АТ к CD 68, Me[Q25;Q75] | 10[10;15] | 15[5;20] | 10[5;15] | 0,29 | 0,35 |
| OPN, медиана экспрессии Me[Q25;Q75] | 3[2;3] | 3[3;3] | 3[2;4] | 0,22 | 0,36 |
| Экспрессия MMP-9, Me[Q25;Q75] | 3[2;4] | 4[3;4] | 4[2;4] | 0,37 | 0,56 |
| Экспрессия TIMP-1, Me[Q25;Q75] | 1[1;2] | 1[1;2] | 2[1;3] | 0,24 | 0,20 |

p* - группа 1-3

p** - группа 2-3

На рисунках 4, 5, 6, 7, 8 представлены результаты иммуногистохимического исследования биоптатов ран до лечения.

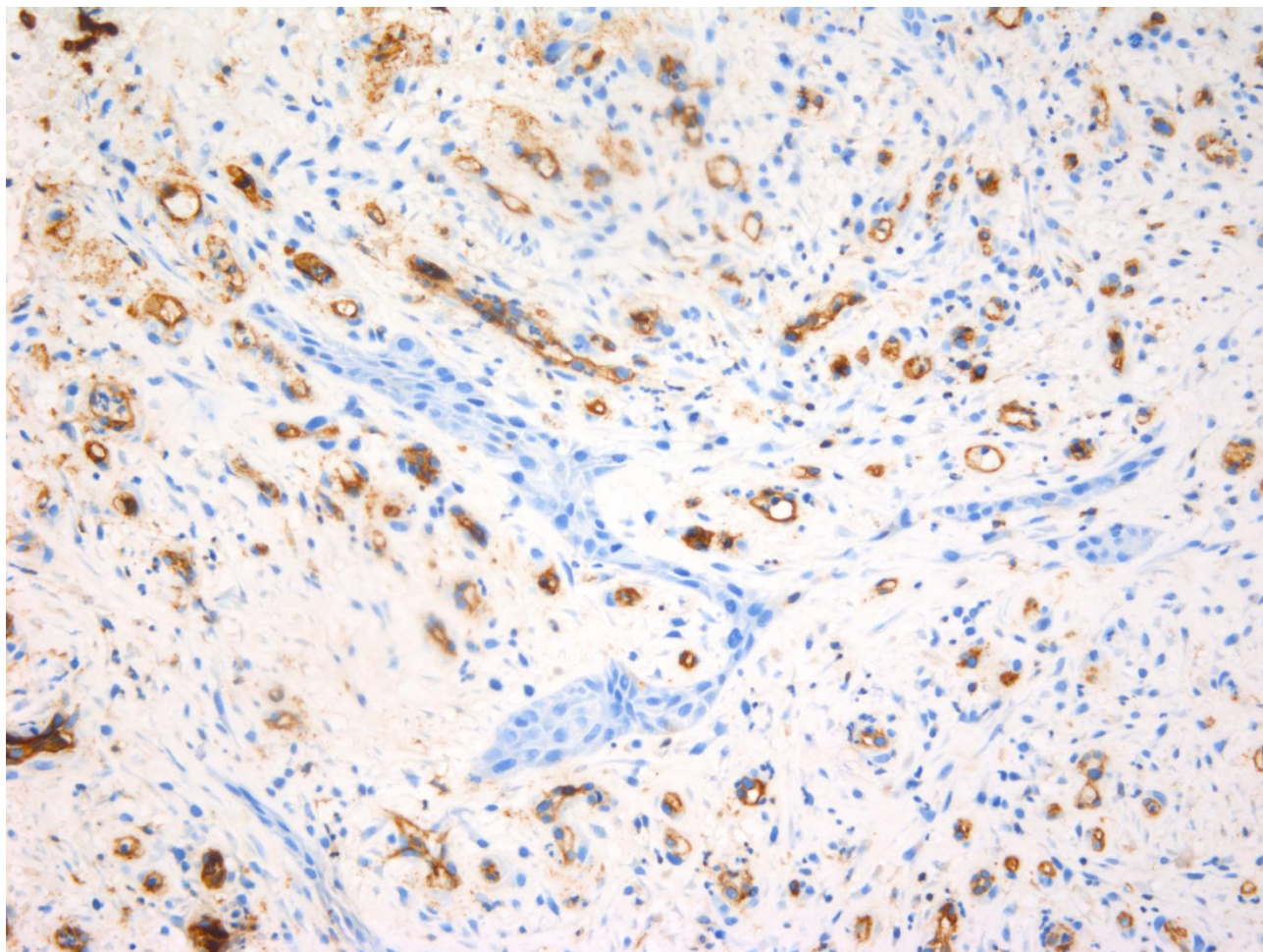


Рисунок 4. Иммуногистохимическая картина окрашивания эндотелия сосудов с помощью антител к CD31 до лечения (x200).

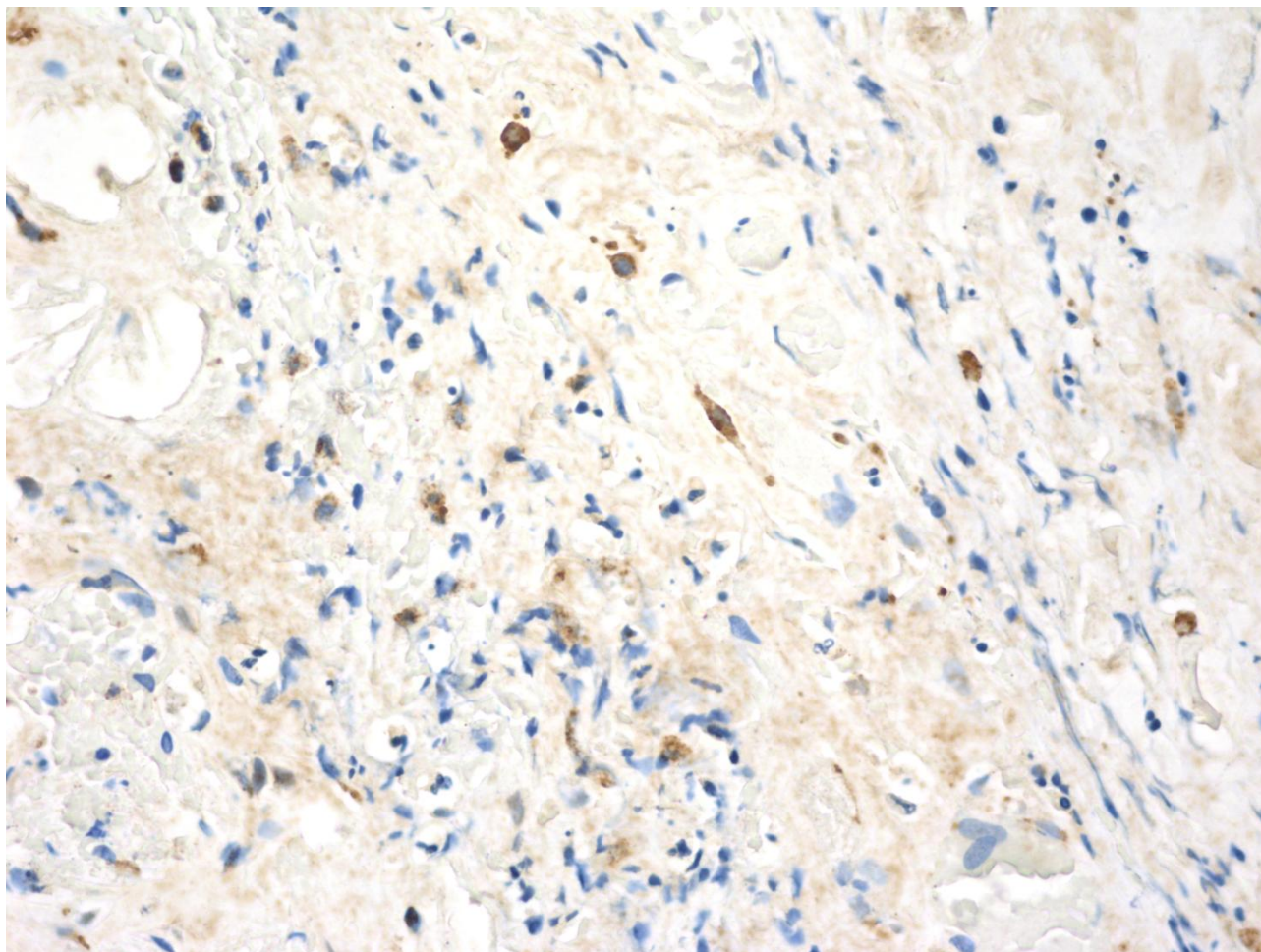
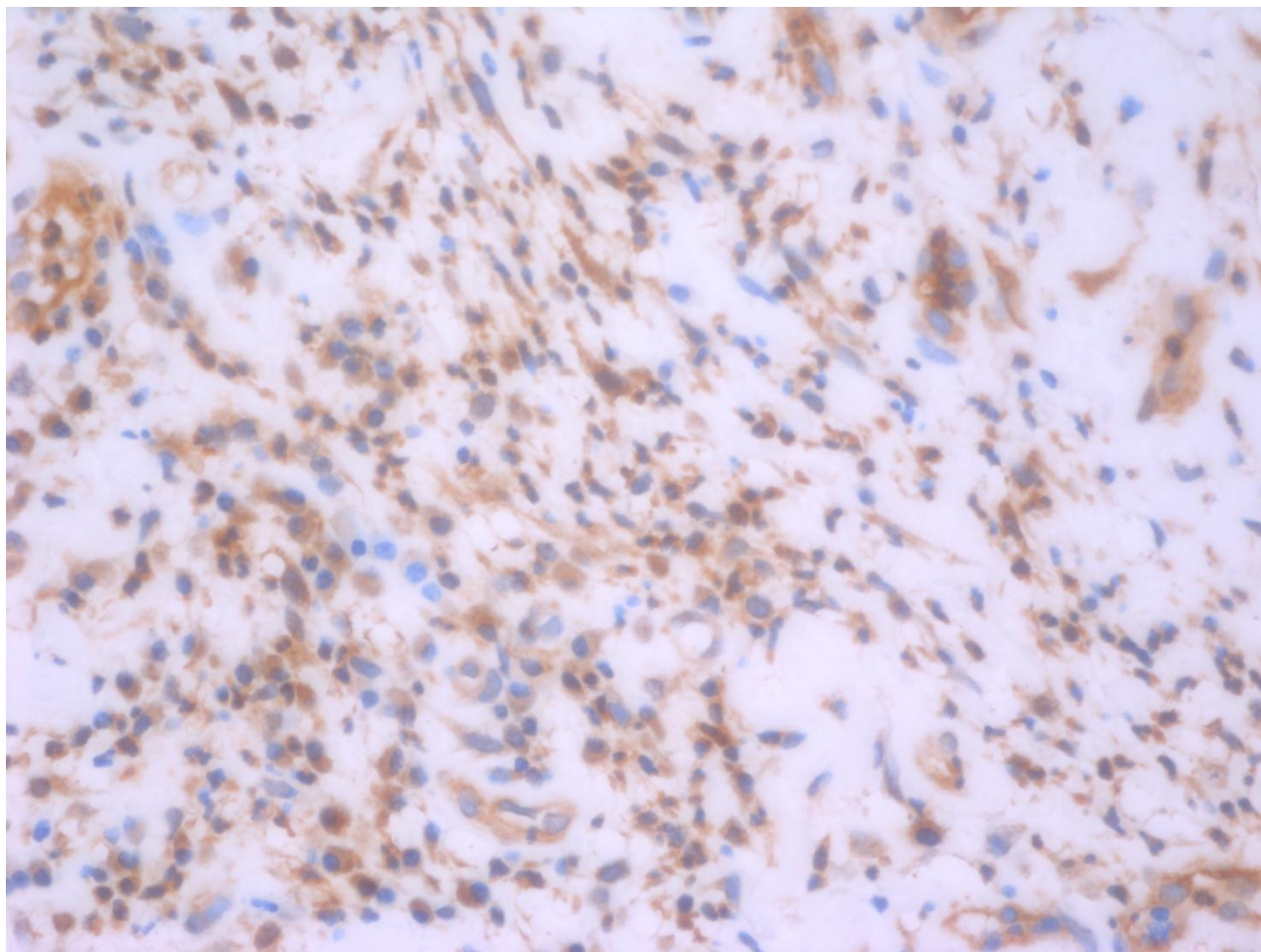


Рисунок 5. Иммуногистохимическая картина биоптата раневого дефекта до лечения. Окрашивание макрофагов с помощью антител к CD68 до лечения (x200).



**Рисунок 6. Иммуногистохимическая картина биоптата раны до лечения.
Окрашивание антител к остеопонтину (x400)**

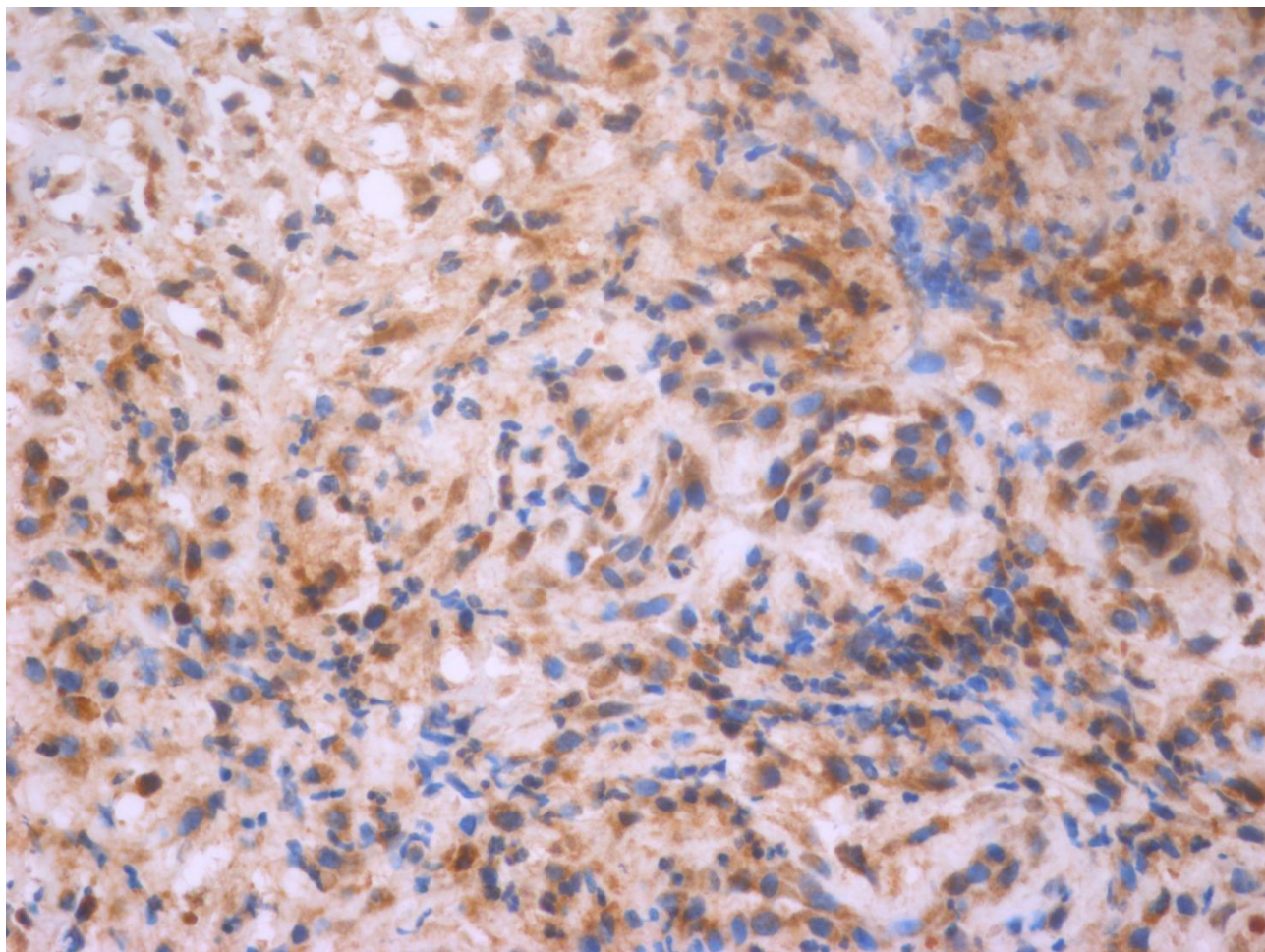


Рисунок 7. Иммуногистохимическая картина окрашивания антител ММР-9 (x400).

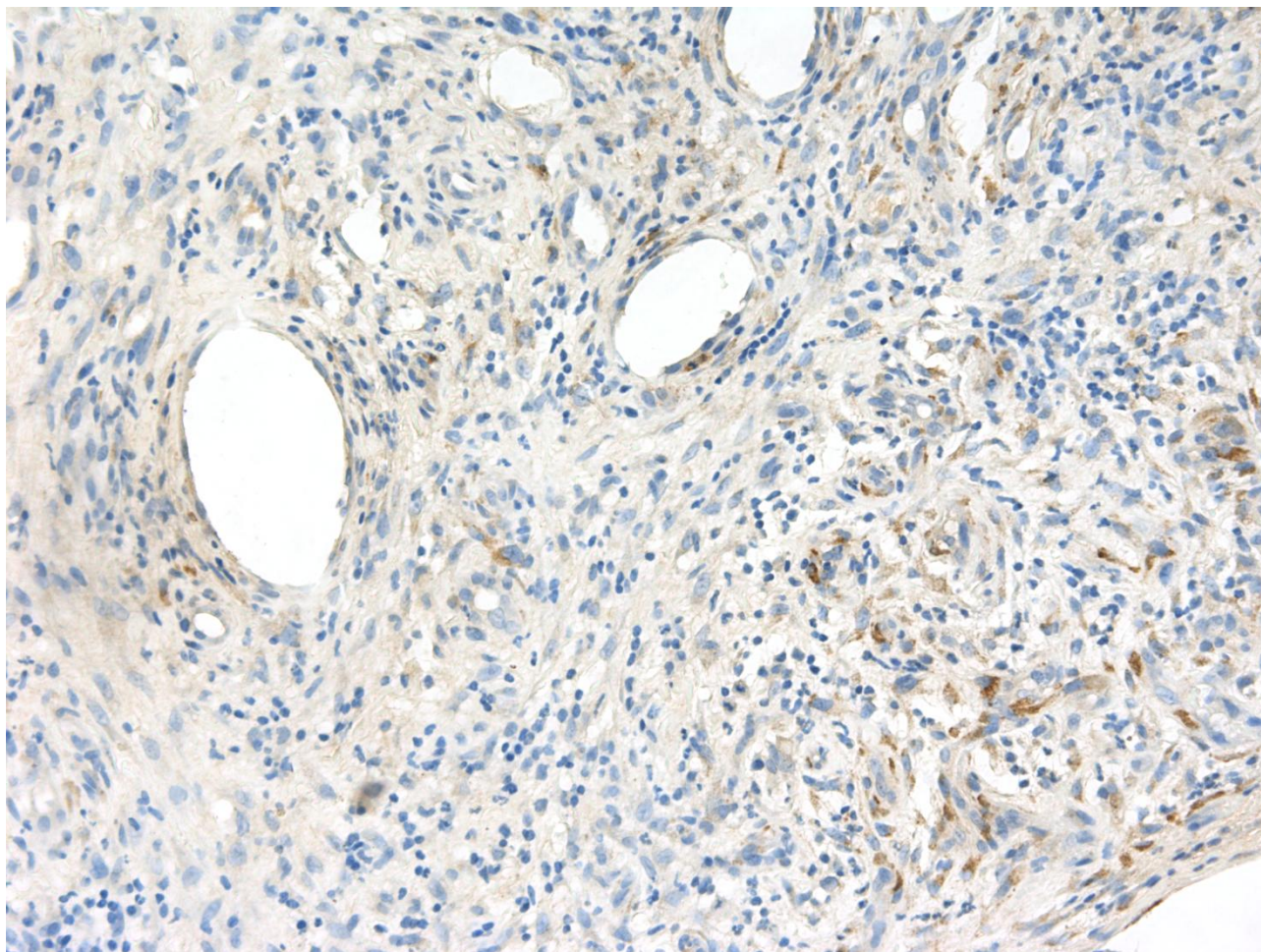


Рисунок 8. Иммуногистохимическая картина биоптата раны до лечения. Окрашивание с помощью антител к TIMP-1 (x400).

Глава 4. Характеристика пораженной зоны нижних конечностей обследованных больных после лечения

4.1. Клиническая характеристика раневых дефектов стоп у пациентов после лечения

Медиана длительности лечения (Me[Q25; Q75], дни) после проведенной хирургической обработки составляла: в группе 1 - 8[7;10], в группе 2 – 10[8;12], в группе 3 - 8[7;10] дней. Группы были сопоставимы по количеству дней проводимого лечения ($p > 0.05$).

4.1.1. Влияние терапии отрицательным давлением на процесс заживления ран по сравнению с контрольной группой

На фоне терапии в обеих группах зафиксировано сокращение размеров ран, как площади, так и глубины. Однако, в группе вакуум-терапии данные показатели были значительно выше, чем в группе контроля.

Несмотря на то, что статистических различий в разнице площади в группе 1 и группе 3 после лечения выявлено не было ($p = 0.55$), определяется четкая тенденция к более быстрому сокращению площади ран на фоне терапии отрицательным давлением.

Так, площадь ран в группе 1 сократилась до 16.2 см² [12.0;27.8] (исходно 25.0 см² [16.2; 44.5], $p < 0.001$ и в группе 3 до 13.2 см² [10.2;40.0] (до лечения - 23.5 см² [12.3; 55.3]), $p < 0.001$. Разница параметров площади на фоне лечения в группе 1 составила 19,8% [10.0; 37.1], в группе 3 – 17,0% [13.3;26.7], группы по данному показателю статистически не различались, $p = 0.88$.

Обращает на себя внимание тот факт, что исходно медиана площади ран была больше в группе 1, таким образом, можно предположить, что вакуум-терапия более эффективно влияет на сокращение площади ран, чем стандартное лечение. На рисунке 9 представлены показатели площади ран в группе 1 и 3 на фоне лечения.

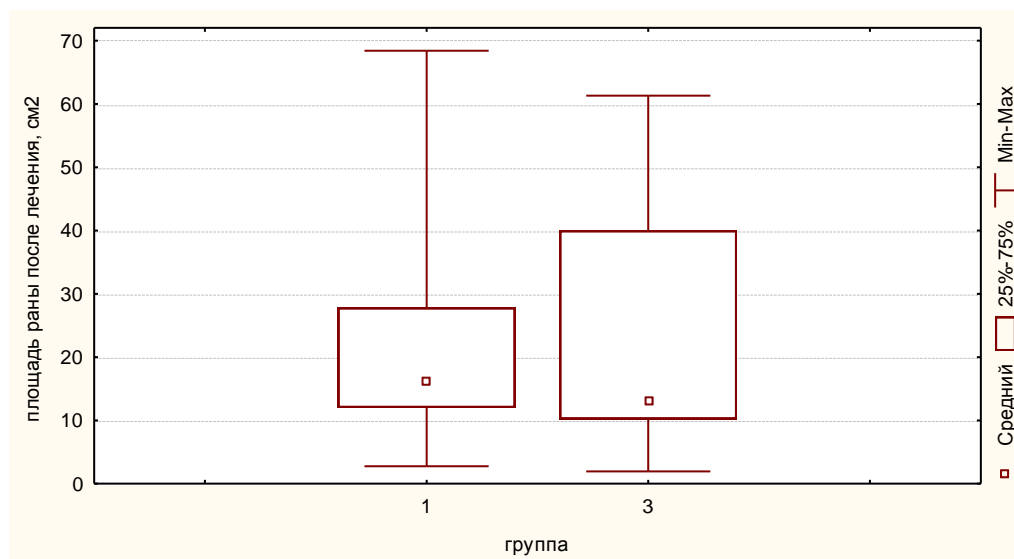


Рисунок 9. Площадь ран после лечения в группах 1 и 3.

На фоне терапии в группе 1 глубина раневых дефектов составляла 1.5[10.2 2.8] (до лечения – 3,3[1.5; 6.5], $p < 0.001$), в группе 3 - 2.8 [1.9;3.9] см (исходно – 3,2 [2.4; 5.2], $p < 0.001$). Однако, несмотря на такие существенные различия в глубине раневых дефектов в обеих группах, разница между группами была недостоверной - $p = 0.06$.

Несмотря на это, динамика сокращения глубины ран на фоне вакуум-терапии была более выраженной: так, через 8[7;10] дней терапии в группе 1 глубина уменьшилась на 42,8% [24.3;60], а в группе 3 на 16.6% [12.5;32.2], $p = 0,005$.

На рисунке 10 отображены показатели глубины ран на фоне терапии отрицательным давлением и стандартного лечения.

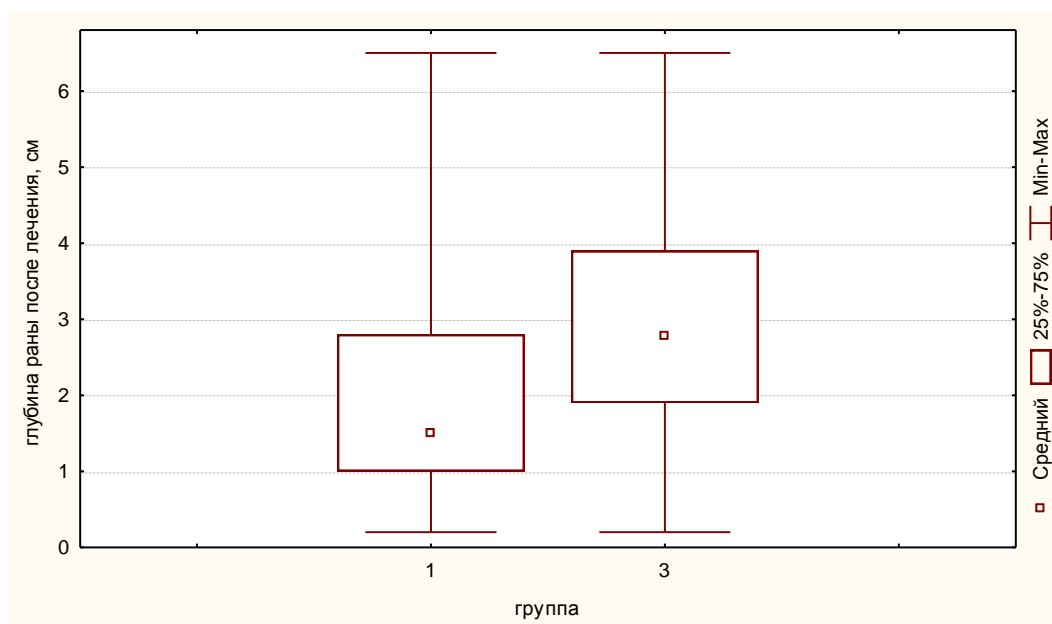


Рисунок 10. Глубина раневых дефектов после лечения в группах 1 и 3.

Также отмечается статистически достоверное уменьшение интенсивности болевого синдрома на фоне проводимой терапии.

В группе 1 болевой синдром из стадии умеренного – 2 балла[1;3] перешел в стадию слабо выраженного - 1 балл[1;2], $p = 0.001$.

Если в группе 3 до начала терапии отмечали сильную боль в пораженной конечности 3 балла [2;4], то на фоне терапии пациенты испытывали умеренные болевые ощущения - 2 балла[1;3], $p = 0.001$. Выявлены статистически достоверные различия между группами: в группе 1 динамика уменьшения болевого синдрома была лучше по сравнению с группой контроля - $p = 0.04$

4.1.2. Изменения локальной микрогемодинамики на фоне терапии

отрицательным давлением по сравнению со стандартной терапией

На фоне терапии отрицательным давлением зафиксирован прирост транскутанного напряжения кислорода тканей, также как и в группе контроля. Однако, в группе 1 значения $t_{sp}O_2$ тканей после лечения были существенно выше: 52[48;58] мм.рт.ст (исходно – 46 мм.рт.ст. [38;52]), в контрольной группе - 39 [32;47] мм.рт.ст. (до лечения - 43 мм.рт.ст. [38;47]) ($p=0.0007$).

На рисунке 11 представлены показатели транскутанной оксиметрии на фоне местного лечения в группах 1 и 3.

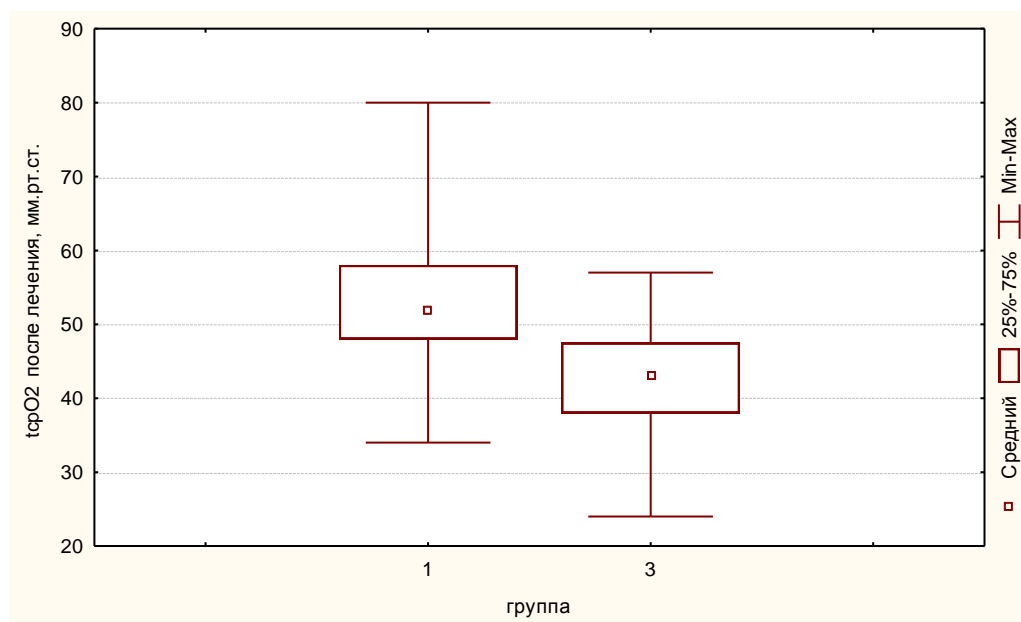


Рисунок 11. Показатели транскутанного напряжения кислорода тканей стоп после лечения в группах 1 и 3.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что терапия отрицательным давлением более эффективно влияет на процесс оксигенации пораженной зоны по сравнению со стандартным лечением у лиц с синдромом диабетической стопы.

4.1.3. Результаты терапии коллаген-содержащими повязками по сравнению с контрольной группой

На фоне терапии в обеих группах удалось достичь сокращения размеров ран, однако в группе, получающей терапию коллаген-содержащими повязками, отмечалось более выраженное уменьшение площади и глубины раневых дефектов по сравнению с группой 3.

Площадь ран после местного лечения коллагеном составила 5.7 см^2 [2.3;14.7] (до лечения – 18.6 см^2 [15.3; 22.8], $p < 0.001$), в группе стандартного лечения - 13.2 см^2 [10.2;40.0] (исходно - 23.5 см^2 [12.3; 55.3], $p < 0.001$), различия между группами после лечения были достоверными: $p = 0.002$

В ходе лечения площадь ран уменьшилась на 26,4% [11.7; 32.4] в группе 2, в отличие от группы на стандартной терапии, где разница площади составила 17% [13.3; 26.7] ($p = 0.002$). На рисунке 12 представлены значения площади ран на фоне лечения в группах 2 и 3.

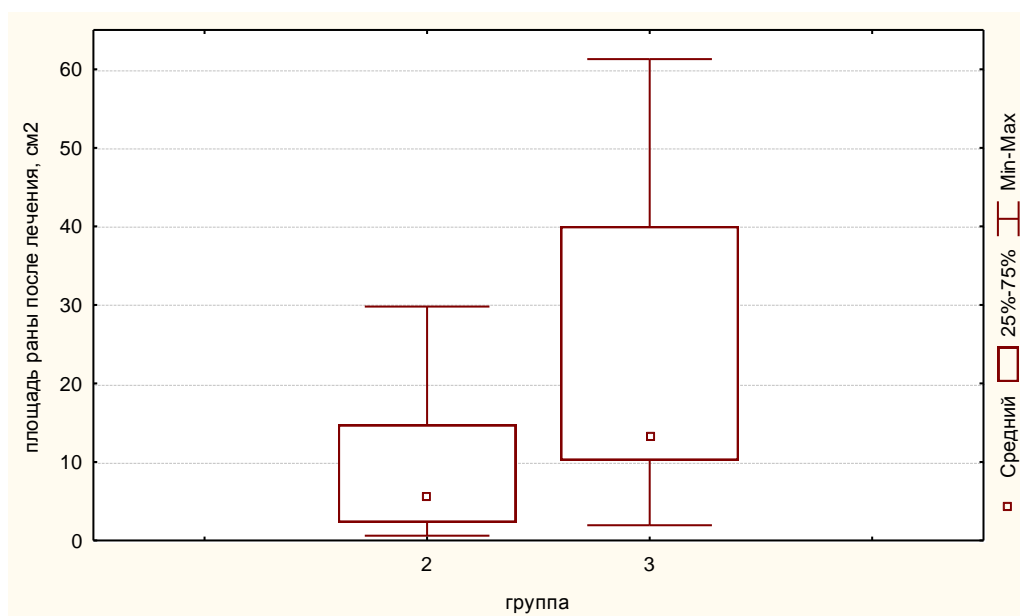


Рисунок 12. Площадь ран после лечения в группах 2 и 3.

Глубина раневых дефектов после терапии коллагеном составила 1.0 см [0.9;2.0] (до лечения - 2,8[2.2; 3.2], $p < 0.001$), в группе контроля - 2.8 см [1.9; 3.9] (исходно

3.2 [2.4; 5.2], $p < 0.001$), различия между группами были статистически значимыми - $p = 0.002$.

На рисунке 13 обозначены показатели глубины ран после лечения в группах 2 и 3. Таким образом, в группе 2 глубина раневых дефектов сократилась на 30,4% [20.0; 41.1], по сравнению с исходными данными, в то время как в группе 3 данный показатель равнялся 16.6% [12.5; 32.2] ($p = 0.02$).

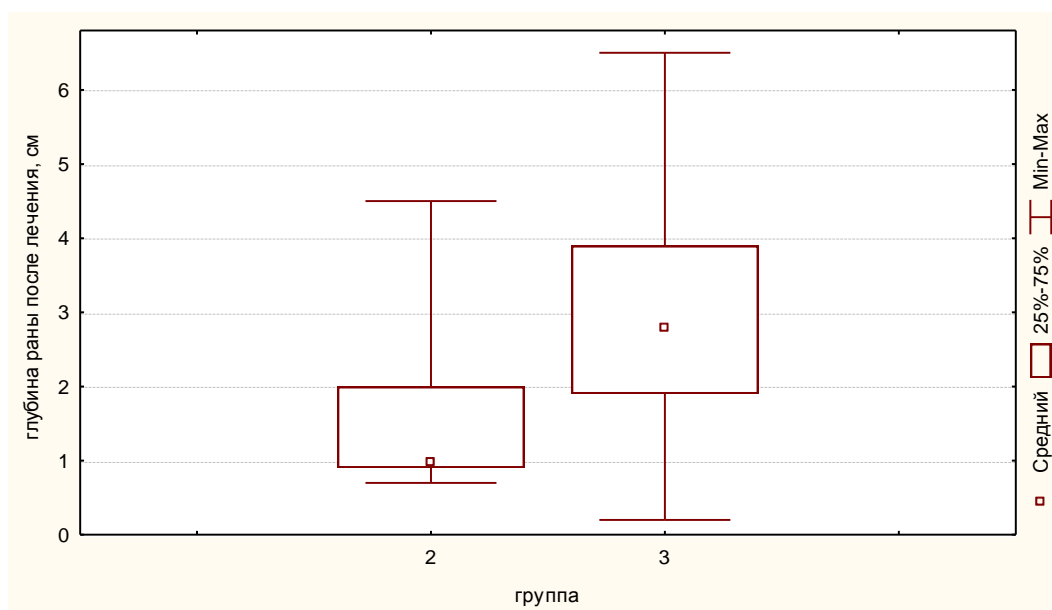


Рисунок 13. Глубина раневых дефектов после лечения в группах 2 и 3.

Была изучена динамика болевого синдрома на фоне проводимого местного лечения.

Так, в группе 2 болевой синдром из стадии умеренного - 2[2;3] балла - перешел в стадию слабо выраженного 1[1;2] балла, $p = 0.001$.

В группе 3 до начала терапии отмечали сильную боль в пораженной конечности - 3[2;4] балла, а на фоне лечения болевой синдром приобретал характер умеренного - 2[1;3] балла, $p = 0.001$. Выявлены статистически достоверные различия между группами: в группе 2 динамика уменьшения болевого синдрома была лучше по сравнению с группой контроля - $p = 0.02$.

4.1.4. Изменения локальной микрогемодинамики на фоне терапии коллагеном и стандартного лечения

По данным транскутанной оксиметрии отмечается более выраженное усиление локальной микроциркуляции в группе 2 по сравнению с группой 3 после лечения: в группе 2 – 48 мм.рт.ст. [45; 53] (исходно – 47 мм.рт.ст. [41; 51]), $p=0.02$; в группе 3 – 39 мм.рт.ст. [32;47] (до лечения - 43 мм.рт.ст. [38; 47]), $p = 0.017$.

Группы 2 и 3 достоверно различались между собой по показателям транскутанной оксиметрии тканей перираневого области на фоне лечения, $p = 0.02$.

На рисунке 14 представлены показатели транскутанного напряжения кислорода тканей перираневого области после лечения в группах 2 и 3.

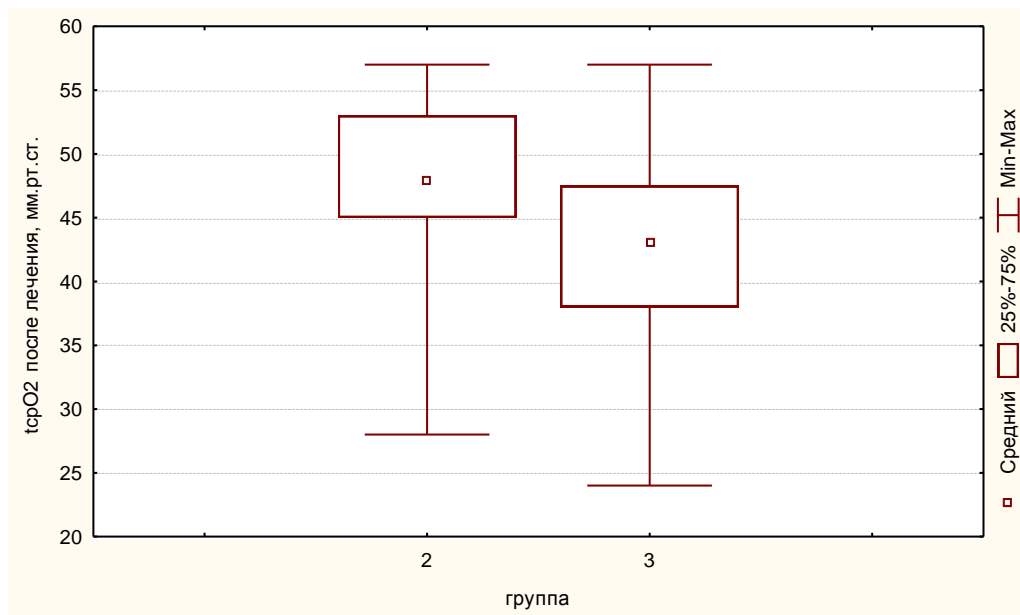


Рисунок 14. Показатели транскутанной оксиметрии тканей стопы после лечения в группах 2 и 3.

4.1.5. Клинические случаи применения различных видов местного лечения у лиц с нейропатической и нейроишемическими формами СДС

- **Клинический случай применения терапии отрицательным давлением у пациента с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.**

Больной К., 65 лет находился на стационарном лечении в отделении диабетической стопы ФГБУ ЭНЦ с 08.10.2012 по 6.11.2012.

При поступлении предъявлял **жалобы на** наличие длительно незаживающего раневого дефекта в области ампутации 3-5 пальцев правой стопы, отеки нижних конечностей, одышку в покое, боли в спине.

Клинический диагноз при поступлении:

Основной диагноз: Сахарный диабет 2 типа. Ожирение 1 ст.

Осложнения основного заболевания: Нейроишемическая форма синдрома диабетической стопы. Инфицированная послеоперационная рана правой стопы, Wagner III. Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, состояние после баллонной ангиопластики передней большеберцовой артерии (ПББА) и тыльной артерии стопы (ТАС) справа от июля 2012 года. Непролиферативная диабетическая ретинопатия обоих глаз. Артифакция. Диабетическая нефропатия на стадии протеинурии. Хроническая болезнь почек (ХБП) 3.

Сопутствующие заболевания: Гипертоническая болезнь 2 ст, 2 ст, риск 4. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) 2.

Из анамнеза известно, что сахарный диабет 2 типа выявлен в 2000 году. Гликемия в дебюте составляла 7-8 ммоль/л. Назначена пероральная сахароснижающая терапия (ПССП). Диету не соблюдал. Контроля гликемии не проводилось. В 2006 году в связи с декомпенсацией углеводного обмена переведен инсулинотерапию аналогами человеческих инсулинов в режиме многократных инъекций (Гларгин и Аспарт), на которой находился на момент поступления в ФГБУ ЭНЦ. Гликемический контроль нерегулярный,

гликированный гемоглобин не контролируется. Количественной оценкой углеводов по системе хлебных единиц (ХЕ) не владеет.

После травмы стопы летом 2012 года отметил появление отделяемого из раны. В июле 2012 года госпитализирован в стационар по месту жительства, где проводилась системная антибактериальная терапия и ежедневные перевязки с раствором Бетадин - без эффекта. При дуплексном сканировании артерий нижних конечностей выявлен гемодинамически значимый стеноз ПББА и ТАС, в связи с чем проведена баллонная ангиопластика правой ПББА и ТАС с удовлетворительным ангиографическим результатом.

В дальнейшем диагностирована флегмона правой стопы, проведено ее вскрытие и экзартикуляция 3-5 пальцев правой стопы. Рана велась открытым способом. Закрытия раневого дефекта длительное время достичь не удавалось. По данным рентгенографии выявлен хронический остеомиелит головки 2 плюсневой кости.

У пациента имелись микрососудистые осложнения сахарного диабета: диабетическая нефропатия на стадии протеинурии, непролиферативная диабетическая ретинопатия.

Повышение АД фиксируется с 2002 года, максимально до 180/100 мм.рт.ст. В настоящее время принимает Небилет 5 мг, Диувер 5 мг, Торвакард 20 мг, Кардиомагнил 75 мг. АД в пределах 120-130/70-80 мм.рт.ст.

Эпизодически беспокоят колющие боли в области сердца, купирующиеся самостоятельно.

Около 2-3 месяцев назад отметил усугубление одышки - появление одышки в покое и при минимальной физической нагрузке.

Пациент госпитализирован в ФГБУ ЭНЦ для проведения лечения длительно незаживающего язвенного дефекта правой стопы и пластики раны.

Данные осмотра при поступлении

Общее состояние средней тяжести. Конституция гиперстеническая. Рост 172 см. Вес 100 кг. Индекс массы тела (ИМТ) 33,80 кг/м². Кожные покровы: нормальной влажности и тургора Видимые слизистые: чистые. Подкожная жировая клетчатка: Развита избыточно, распределена преимущественно по абдоминальному типу.

Лимфатические узлы: не увеличены. АД - 130/80 мм рт.ст., ЧСС - 71 в мин., аускультативно тоны сердца приглушены, ритмичны, акцент 2 тона над аортой, перкутано – границы сердца расширены влево. В легких - дыхание жесткое, проводится во все отделы, хрипов нет, ЧДД 16 в мин. По остальным органам и системам – без особенностей.

St.localis при поступлении: Послеоперационная рана правой стопы с признаками инфицирования. Определяется свищ с гнойным отделяемым у основания 2 пальца справа. Левая стопа теплая, несколько отека. Вибрационная чувствительность – с обеих сторон 1-2 УЕ, тактильная – слева снижена, справа отсутствует, температурная отсутствует с обеих сторон. Пульсация на артериях стоп сохранена.

В лабораторных исследованиях крови: Нв -126 г/л, Нт – 37,8%, эритроциты - $4,32 \cdot 10^{12}/л$, лейкоциты - $9,98 \cdot 10^9/л$, нейтрофилы – $6,76 \cdot 10^9/л$ СОЭ – 54 мм/мин. Холестерин общ – 3.63 ммоль/л, ЛПВП – 0.7 ммоль/л, ЛПНП – 1.8 ммоль/л, триглицериды – 2,42 ммоль/л, СКФ (MDRD) – 76 мл/ мин/1,73 м².

Гликированный гемоглобин – 7,4%.

Альбумин мочи (разовая порция) – 36 мг/л, креатинин – 4544 мкмоль/л, альбумин/креатинин - 8.14 мг/ммоль.

ЭКГ от 08.10.2012: Ритм синусовый с ЧСС 84 в мин. Отклонение электрической оси сердца влево. Изменение предсердного компонента. Неполная блокада левой ножки пучка Гиса с преобладанием черт передней блокады, рубцовых изменений в передне-перегородочной области расширения полостей сердца. Гипертрофия левого желудочка.

Эхокардиография от 08.10.2012: Дилатация полостей левого и правого предсердий. Размеры правого желудочка и восходящего отдела аорты - на верхней границе нормы. Гипертрофия миокарда левого желудочка (ЛЖ). Уплотнены с включениями кальция стенки корня и восходящего отдела аорты. Уплотнены с включениями кальция створки и подклапанные структуры митрального клапана. Уплотнена поверхность эндокарда в полости ЛЖ. Убедительных данных за наличие зон акинезии миокарда ЛЖ не получено.

Дуплексное сканирование артерий нижних конечностей от 9.10.12:

Справа: Общая бедренная артерия (ОБА) – стеноз 45-50% за счет циркулярной, гиперэхогенной атеросклеротической бляшкой (АСБ). Кровоток магистральный. Глубокая артерия бедра (ГАБ) – в устье циркулярная, гиперэхогенная АСБ, стеноз 35%. Кровоток магистральный. Поверхностная бедренная артерия (ПБА) – в устье циркулярная кальцинированная АСБ, стеноз 35%, кровоток магистральный. На протяжении по передней и задней стенкам определяются пролонгированные кальцинированные АСБ, стенозирующие просвет сосуда до 55% в средней и нижней трети бедра. Подколенная артерия (ПА) – проходима, на протяжении тубулярная, неравномерно суживающая просвет сосуда гиперэхогенная АСБ, стеноз 55%.

Малоберцовая артерия (МБА) – картируется с коллатеральным кровотоком в нижней трети голени, в средней трети голени картируется с коллатеральным кровотоком редкими фрагментами, в верхней трети голени не картируется в режиме ЭДК. ПББА – в устье стеноз около 75%, на всем протяжении проходима с высокоскоростным коллатеральным кровотоком. На границе средней и нижней трети голени фрагмент стеноза около 65-70%. Задняя большеберцовая артерия (ЗББА) – картируется в нижней трети голени с коллатеральным кровотоком, верхней и в средней трети голени картируется фрагментарно. ТАС – картируется в проксимальной части стопы с высокоскоростным коллатеральным кровотоком.

Слева: ОБА – стеноз 50% за счет циркулярной, гиперэхогенной АСБ. Кровоток магистральный. ГАБ – в устье циркулярная, гиперэхогенная АСБ, стеноз 35%. Кровоток магистральный. ПБА – в устье циркулярная кальцинированная АСБ, стеноз 35%, кровоток магистральный. На протяжении по передней и задней стенкам определяются пролонгированные кальцинированные АСБ, стенозирующие просвет сосуда до 55% в средней и нижней трети бедра. ПА – проходима, на протяжении тубулярная, неравномерно суживающая просвет сосуда гиперэхогенная АСБ, стеноз 45%, стеноз около 60% на уровне щ.к.с. Кровоток магистрально-измененный. МБА – картируется с коллатеральным кровотоком на всем протяжении, в устье стенозирована до 75%. ПББА – стенки

артерий кальцинированы, утолщены. Артерия стенозирована до 60-65%, с участками стеноза до 75%. ЗББА – картируется в нижней трети голени с коллатеральным кровотоком, верхней и в средней трети голени картируется фрагментарно. ТАС – картируется в проксимальной части стопы с коллатеральным кровотоком.

Транскутанная оксиметрия от 9.10.12: справа – 43 мм.рт.ст.

10.10.12 проведена хирургическая обработка раны аппаратом VersaJet.

В послеоперационной периоде с целью уменьшения экссудации, стимуляции процессов репарации и регенерации начата терапия отрицательным давлением в режиме -90 мм.рт.ст. на 7 суток.

На фоне проведенного лечения отмечается значительное уменьшение размеров раневого дефекта (в 1.5 раза), дно раны поднялось на 1.4 см, покрыто грануляциями. Количество удаленного экссудата - 50 мл.

18.10.12 - проведена пластика раневого дефекта местными тканями. Послеоперационный период гладкий.

Проведено лечение:

1. Инсулин Гларгин 45 ЕД в 22.00
2. Инсулин Аспарт 12-16 ЕД перед основными приемами пищи
3. Бисопролол 5 мг вечером
4. Фуросемид 80 мг утром
5. Аторвастатин 20 мг после ужина
6. Ацетилсалициловая кислота 75 мг после ужина
7. Клопидогрел 75 мг вечером
8. Цефтазидим 1.0 2 раза в день (с 10.10.12 до 18.10.12)
9. Имипинем 500 мг 3 раза в день (с 18.10.12 по 29.10.12)
10. Бифиформ по 2 капс. 3 раза в день (с 23.10.12 по 6.11.12)
11. Аллопуринол 100 мг утром
12. Разгрузка нижних конечностей с помощью кресла-каталки

На момент выписки **St.localis**: Отека, гиперемии стопы нет, область швов без признаков воспаления. Швы сняты. Перевязка с раствором Бетадин.

Пациент выписан из стационара в удовлетворительном состоянии с рекомендациями.

На рисунке 15 представлена динамика внешнего вида раневого дефекта пациента К. на фоне проводимой терапии отрицательным давлением.



Рисунок 15. Динамика состояния раневого дефекта на фоне местного применения отрицательного давления.

А – внешний вид стопы после проведенной хирургической обработки. В дне раны визуализируются остатки гемостатической губки

Б – состояние после 7 дней терапии отрицательным давлением -90 мм.рт.ст.

В – внешний вид стопы на 17-е сутки пребывания больного в стационаре. Состояние после пластического закрытия раны местными тканями.

- **Клинический случай применения коллаген-содержащих повязок у пациента с нейропатической формой синдрома диабетической стопы**

Больной Б., 67 лет находился на стационарном лечении в отделении диабетической стопы ФГБУ ЭНЦ с 29.08.2014 по 22.09.2014

При поступлении предъявлял **жалобы на** боль и покраснение правой стопы после механической травмы.

Клинический диагноз при поступлении:

Основное заболевание: Сахарный диабет 2 типа. Ожирение I степени.

Осложнения основного заболевания: Дистальная диабетическая полинейропатия. Нейропатическая форма синдрома диабетической стопы. Абсцесс плантарной поверхности правой стопы. Непролиферативная диабетическая ретинопатия обоих глаз. Диабетический макулярный отек обоих глаз.

Сопутствующие заболевания: Вторичная катаракта. Гиперметропия слабой степени. Гипертоническая болезнь II, степень 2, риск 4 (очень высокий). Распространенный атеросклероз. Дислипидемия II b.

Из анамнеза известно, что страдает сахарным диабетом с 1990 года. В дебюте заболевания гликемия в пределах 6,0 - 7,0 ммоль/л. Инициирована терапия ПССП. С 2007 г переведен на инсулинотерапию аналогом человеческого инсулина средней продолжительности действия: Протафан. Сахароснижающая терапия на момент поступления: Протафан по 25 ЕД утром и вечером. В 2007 г. Проведена ампутация 5-го пальца правой стопы, в связи с развитием гангрены. Показатели гликемии на момент поступления в пределах 5,8 - 18,0 ммоль/л. Гликемию измеряет 2 раза в сутки. Обучение самоконтролю СД по структурированной программе не проходил. В июле 2014 года произошла механическая травма правой стопы. Проведен курс антибиотикотерапии Таваником. В августе при осмотре в кабинете «Диабетической стопы» рекомендованы ежедневные перевязки, антибиотикотерапия и разгрузка стопы, однако в течении последующих 10 дней отмечалось ухудшение состояния, диагностирован абсцесс правой стопы. 28.08.2014 проведено вскрытие абсцесса, получено 3 мл жидкого

гноя. 29.08.2014 пациент госпитализирован в отделение диабетической стопы с целью проведения оперативного лечения абсцесса плантарной поверхности правой стопы. 09.2014 диагностирована непролиферативная диабетическая ретинопатия. Данных за наличие нефропатии не предоставлено. В течение длительного времени страдает артериальной гипертензией (максимальное АД до 180/90 мм.рт.ст), получает гипотензивную терапию: Энап 25 мг утром.

Данные осмотра при поступлении

Общее состояние удовлетворительное. Конституция гиперстеническая. Кожные покровы: нормальной влажности и тургора. Подкожная жировая клетчатка развита избыточно, распределена преимущественно по абдоминальному типу. Телосложение правильное. Рост 164 см. Масса тела 89 кг. ИМТ 33,09 кг/м². АД 150/90 мм рт.ст., область сердца - не изменена, аускультативно - тоны сердца приглушены, ритмичны, патологические шумы не выслушиваются, перкуссия сердца - границы сердца расширены влево. По остальным органам – без особенностей.

St.localis при поступлении: Кожа стоп сухая, на ощупь теплая. Правая стопа: несколько отека, подошвенная поверхность гиперемирована. В центре определяется абсцесс. Состояние после ампутации 5-го пальца. Тактильная, температурная, вибрационная чувствительность - снижены. Пульсация ТАС и ЗББА – сохранена.

В лабораторных исследованиях крови: Нб -166 г/л, Нт – 46,5%, эритроциты - $5,52 \cdot 10^{12}/л$, лейкоциты $-5,8 \cdot 10^9/л$, нейтрофилы – $6,22 \cdot 10^9/л$ СОЭ – 52 мм/мин. Холестерин общ – 6,1 ммоль/л, ЛПВП – 0,87 ммоль/л, ЛПНП – 4,3 ммоль/л, триглицериды – 2,2 ммоль/л, СКФ (MDRD) – 87 мл/ мин/1,73 м²

Гликированный гемоглобин – 8,6 %.

Альбумин мочи (разовая порция) – 65 мг/л, креатинин – 9280,8 мкмоль/л, альбумин/креатинин – 7,0 мг/ммоль.

ЭКГ от 29.08.2014: Ритм синусовый с ЧСС 90 в мин. Отклонение электрической оси сердца влево. Изменение предсердного компонента. Снижение коронарного кровоснабжения в обл.высокой боковой стенки левого желудочка. Полная

блокада правой ножки п.Гиса и передней ветви левой ножки п.Гиса. Возможно гипертрофия левого желудочка и гипертрофия м/желудочковой перегородки.

УЗДГ артерий нижних конечностей от 22.09.14: СЛЕВА И СПРАВА: ОБА: стенка атеросклеротически изменена, утолщена, кровоток магистрального типа, стеноз в устье 40%. ГБА: стенка атеросклеротически изменена, утолщена, кровоток магистрального типа, стеноз в устье 50%. ПБА: Стенка атеросклеротически изменена, кровоток магистрального типа. Стеноз до 50%. ПА: стенка атеросклеротически изменена, утолщена, кровоток магистрального типа. Стеноз 50% (по диаметру) на уровне щели коленного сустава за счет концентрического утолщения стенок. Тибеоперонеальный ствол и ПББА в устье с магистральным кровотоком. ЗББА: стенка незначительно утолщена, с фрагментарным нарушением дифференциации на слои, кровоток магистрального типа. ПББА: стенка незначительно утолщена, с фрагментарным нарушением дифференциации на слои, кровоток магистрального типа. МБА: визуализируется в В-режиме в виде трубчатого образования с утолщенными стенками, в режиме ЭДК не окрашивается. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Атеросклероз артерий нижних конечностей. Стеноз обеих общих бедренных артерий 40%, стеноз глубокой артерии бедра 50%, стеноз поверхностной бедренной артерии 40%, стеноз подколенных артерий 50%.

Транскутанная оксиметрия от 10.09.14: справа – 42 мм.рт.ст.

02.09.2014 проведена операция в объеме вскрытия абсцесса подошвенной поверхности правой стопы. В послеоперационном периоде проводилась антибактериальная терапия, перевязки с коллаген-содержащими повязками Promogran, разгрузка стопы при помощи кресла-каталки. На этом фоне наблюдается положительная динамика: отека и гиперемии стопы нет, рана чистая значительно сократилась в размерах, гранулирует.

Пациент выписан из стационара в удовлетворительном состоянии. Продолжено амбулаторное наблюдение. Рана самостоятельно эпителизировалась через 2 месяца после выписки из стационара.

Проведено лечение:

- 1) Двухфазный инсулин Аспарт 34 ед. подкожно перед завтраком, 30ед. перед ужином
- 2) Метформин 1000 мг – утром и вечером
- 3) Цефтазидим по 1,0 3 раза в сутки в/в капельно
- 4) Эналаприл по 10 мг - утром и вечером
- 5) Бисопролол по 5 мг – утром
- 6) Розувастатин по 10 мг – вечером
- 7) разгрузка нижних конечностей с помощью кресла-каталки

На рисунке 16 изображен внешний вид раневого дефекта пациента Б. на фоне местного применения коллагена.



Рисунок 16. Внешний вид раны на фоне терапии коллаген-содержащими повязками.

А – внешний вид стопы после вскрытия абсцесса правой стопы

Б – состояние раны после 7 дней местного лечения коллагеном

В – внешний вид раны на фоне применения коллаген-содержащих повязок через месяц после выписки больного из стационара

- **Клинический случай применения стандартной терапии у пациентки с нейропатической формой синдрома диабетической стопы.**

Пациентка М., 47 лет находился на стационарном лечении в отделении диабетической стопы ФГБУ ЭНЦ с 10.04.2013 по 22.05.2013

При поступлении предъявляла **жалобы на** наличие обширной раны левой стопы, умеренные боли в области раны, снижение остроты зрения.

Клинический диагноз при поступлении:

Основное заболевание Сахарный диабет 2 тип. Ожирение 2 степени.

Осложнение основного заболевания: Дистальная диабетическая полинейропатия. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. Флегмона левой стопы. Некротическая рана подошвенной поверхности 1 пальца левой стопы. Непролиферативная диабетическая ретинопатия. Диабетический макулярный отек.

Сопутствующий: Гипертоническая болезнь 2 стадия, 2 степени, риск 4. Офтальмогипертензия. Миопия слабой степени. Миопический астигматизм слабой степени.

Из анамнеза известно, что сахарный диабет 2 типа диагностирован в 2008 году, дебют заболевания на фоне избыточной массы тела 110 кг (ИМТ-38 кг/м²) с типичной картиной (жажда, полиурия), гипергликемия 17 ммоль/л. Назначен Сиофор 500 мг 3 раза в день. Самоконтроль гликемии 1 раз в день, преимущественно натощак. Показатели гликемии 7-18 ммоль/л. В последующем была проведена коррекция сахароснижающей терапии: увеличение дозы Сиофора до 850 мг 3 раза в день. Уровень гликированного гемоглобина ранее не определялся. Обследование на предмет осложнений сахарного диабета не проводилось. При госпитализации от 10.04.2013, учитывая выраженную декомпенсацию углеводного обмена (гликемия более 28 ммоль/л) инициирована инсулинотерапия. В настоящее время инсулинотерапия: Левемир 16-18 Ед, Новорапид по 6-8 Ед перед основными приемами пищи. С пациенткой проведено индивидуальное обучение принципам самоконтроля, правилам подсчета

углеводов по системе ХЕ, технике инъекции инсулина, правилам купирования гипогликемии и планированию физической нагрузки.

В конце марта 2013года появилась рана 1 пальца левой стопы, стал нарастать отек, гиперемия стопы, в течение последних 2-х недель до госпитализации отмечалось повышение температуры тела до 38 С в вечернее время. В течение недели пациентку беспокоила выраженная слабость, ознобы. Пациентка с вышеуказанными жалобами обратилась ФГБУ ЭНЦ, при осмотре специалистом кабинета "Диабетическая стопа" выявлена флегмона левой стопы. По экстренным показаниям пациентка госпитализирована для хирургического лечения. В течение 10 лет отмечает повышение уровня АД до 160/80 мм рт.ст. Контроль АД нерегулярный. Принимала гипотензивную терапию: Арифон Ретард 1.5 мг. при динамической тонометрии показатели АД в пределах целевых значений (не более 120/80 мм рт.ст) отменена гипотензивная терапия. На момент поступления гипотензивную терапию не получала.

Данные осмотра при поступлении

Конституция нормостеническая. Кожные покровы: нормальной влажности и тургора, обычной окраски. Видимые слизистые: чистые, обычной окраски. Рост 170 см. Масса тела 99 кг. ИМТ 34,26 кг/м². АД - 100/60 мм рт.ст., ЧСС - 65 в мин., область сердца - не изменена, аускультативно тоны сердца приглушены, ритмичны, патологические шумы не выслушиваются. Органы дыхания: аускультация легких - дыхание везикулярное, проводится во все отделы, хрипов нет, ЧДД 18 в мин. По остальным органам и системам – без особенностей.

St.localis при поступлении: Стопы на ощупь теплые. Левая стопа отека, гиперемирована, гиперемия распространяется на тыльную и подошвенную поверхности стопы, где определяется флюктуация, на подошвенной поверхности 1 пальца некротическая рана 1х1 см с обильным гнойным отделяемым.

В лабораторных исследованиях крови: Гемоглобин -108 г/л, гематокрит – 31,6%, эритроциты - $3,7 \cdot 10^{12}$ /л, лейкоциты - $4,82 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилы – $3,24 \cdot 10^9$ /л

СОЭ – 75 мм/мин. Холестерин общ – 3,14 ммоль/л, ЛПВП – 0,75 ммоль/л, ЛПНП – 1,8 ммоль/л, триглицериды – 1,31 ммоль/л, СКФ (MDRD) – 106 мл/ мин/1,73 м²

Гликированный гемоглобин – 10,0%.

Альбумин мочи (разовая порция) – 0,6 мг/л, креатинин – 3721,4 мкмоль/л, альбумин/креатинин – 0,16 мг/ммоль.

ЭКГ от 10.04.2013: Синусовый ритм, ЧСС- 86в мин, нормальное положение ЭОС.

Транскутанная оксиметрия от 15.04.13: справа – 32 мм.рт.ст.

11.04. 2013 проведено вскрытие флегмоны с экзартикуляцией 1 пальца левой стопы.

В послеоперационном периоде проводились ежедневные перевязки с атрауматическими повязками с использованием жидких антисептиков. Учитывая отсутствие положительной динамики раны (избыточная экссудация, низкое качество грануляций, выстилающих раневое ложе), 20.04.13 – проведена повторная хирургическая обработка раны аппаратом VersaJet с иссечением некрозов и патологических грануляций Послеоперационный период гладкий.

30.04.2013 выполнена пластика раны местными тканями. 14.05.2013 Аутодермопластика раны перфорированным кожным лоскутом. На фоне проводимой терапии пересаженный лоскут полностью прижился.

Пациентка выписана из стационара.

Проведено лечение:

1. Инсулин Аспарт по 8-10 Ед перед основными приемами пищи
2. Инсулин Детемир 10 Ед утром, 18 Ед вечером
3. Метформин по 500 мг утром, вечером
4. Аторвастатин 10 мг вечером
5. Ацетилсалициловая кислота 100 мг вечером
6. Цефотаксим 1 г 3 раза в день в/в капельно с 10.04.2013г. по 29.04.2013г.

На рисунке 17 представлен внешний вид стопы пациентки М. на фоне проводимого стандартного местного лечения.



Рисунок 17. Внешний вид стопы на фоне стандартного лечения.

А – Состояние раны после вскрытия флегмоны и экзартикуляции 1 пальца левой стопы

Б – внешний вид раны после 8 дней стандартного лечения

В – Состояние после пластического закрытия раны местными тканями на 20-е сутки пребывания больной в стационаре

Глава 4.2. Морфологическая характеристика репаративных процессов

мягких тканей нижних конечностей на фоне проводимого лечения

Глава 4.2.1. Влияние терапии отрицательным давлением на заживление ран

нижних конечностей при синдроме диабетической стопы

По данным гистологического исследования тканей раневых дефектов на фоне лечения в группе 1 и группе 3 отмечалось уменьшение отека. В группе 1 до лечения - 3[3;4], после лечения - 2[2;2] ($p < 0.001$), так и в группе 3 до лечения - 4[3;4], после лечения - 2[2;3] ($p = 0.002$). Несмотря на то, что различия между группами не были статистически достоверны ($p = 0,18$), в группе 1 определяется четкая тенденция к более выраженному уменьшению отека на фоне лечения.

Достоверных данных об изменениях организации ЭЦМ получено не было ни в одной из групп после терапии, в чем группы были сопоставимы ($p = 0.91$).

В ходе лечения в обеих группах отмечен достоверный переход ран из фазы воспаления в фазу эпителизации; в группе 1 - $p < 0.001$, в группе 3 – $p = 0.02$. При этом статистических различий между группами выявлено не было – $p = 0.18$. Однако, прослеживается тенденция к более выраженной эпителизации в группе 1: 3[3;3] по сравнению с группой контроля 3[2;3] на фоне проводимого лечения. Возможно, это объясняется малой выборкой.

По данным световой микроскопии в группе 1 выявлены статистически значимые различия в формировании зрелой грануляционной ткани. Так, в группе 1 отмечен процесс перехода от молодой грануляционной ткани к зрелой, $p < 0.001$, в отличие от контрольной группы, где было отмечено появление созревающей грануляционной ткани на фоне проводимой терапии, $p < 0.001$.

На рисунке 18 показаны показатели зрелости грануляционной ткани на фоне проводимого лечения в группах 1 и 3.

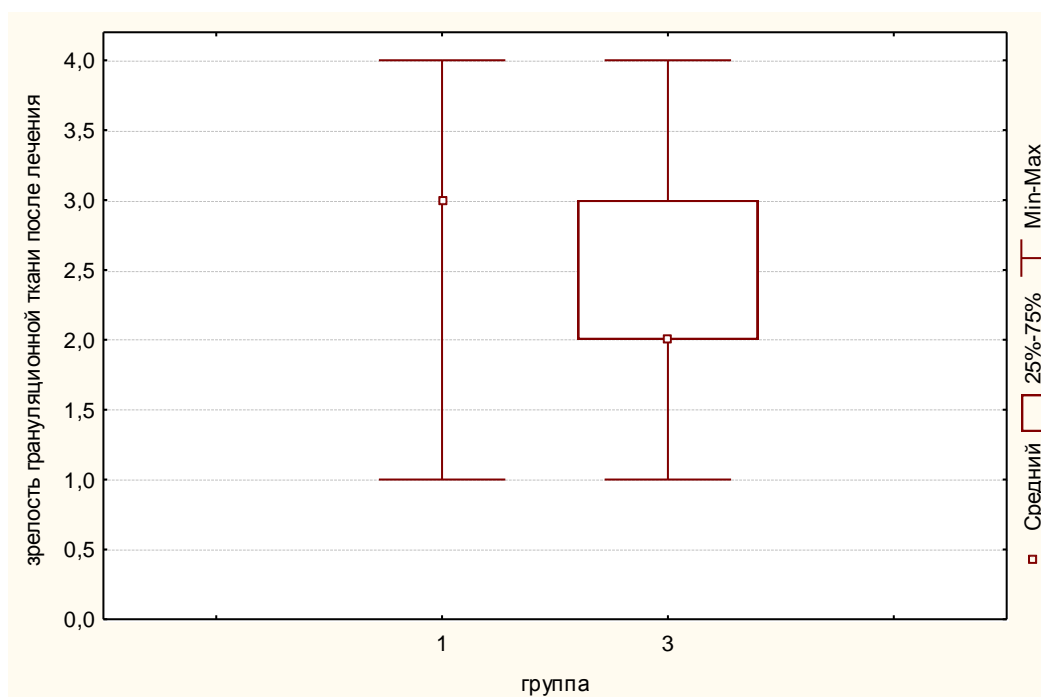


Рисунок 18. Зрелость грануляционной ткани на фоне лечения в группах 1 и 3.

Таким образом, можно предположить, что вакуум-терапия более эффективно влияет на процессы заживления по сравнению со стандартной терапией.

4.2.2. Влияние коллаген-содержащих повязок на процессы репарации у лиц с синдромом диабетической стопы

При анализе результатов гистологического и иммуногистохимического исследований биоптатов тканей раневых дефектов, полученных после хирургической обработки и до начала местного лечения, установлено, что обе группы были сопоставимы по интенсивности репаративных процессов в мягких тканях. В ранах обеих групп отмечался выраженный отек, плохо организованный экстрацеллюлярный матрикс, низкое содержание фибробластоподобных клеток и выраженная воспалительная инфильтрация ($p > 0.05$).

По данным гистологического исследования тканей раневых дефектов на фоне лечения в обеих группах отмечалось уменьшение отека как в группе 2 до лечения - 3[3;4], после лечения - 2[2;2] ($p < 0.001$), так и в группе 3 до лечения - 4[3;4], после лечения - 2[2;3] ($p = 0.002$). Однако, различия между группами были недостоверны ($p = 0.79$).

Достоверных данных об изменениях организации ЭЦМ получено не было ни в одной из групп после терапии, в чем группы были сопоставимы ($p = 0.77$).

По данным световой микроскопии в группе 2 выявлен процесс перехода от молодой грануляционной ткани к зрелой, $p < 0.001$, в отличие от контрольной группы, где было отмечено появление созревающей грануляционной ткани на фоне проводимой терапии, $p < 0.001$. Однако, не смотря на эту тенденцию, показатели между группами статистически не различались ($p = 0.28$).

На рисунке 19 представлены показатели зрелости грануляционной ткани после проводимого лечения коллаген-содержащими повязками и стандартной терапии.

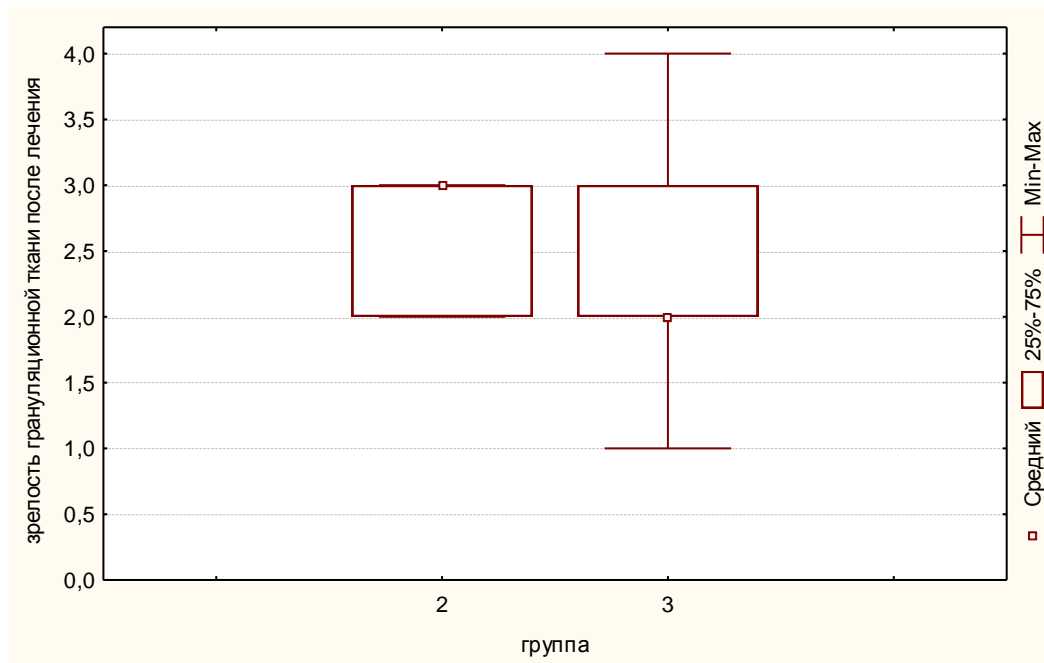


Рисунок 19. Зрелость грануляционной ткани после лечения в группах 2 и 3.

Глава 4.3. Иммуногистохимические особенности заживления ран у лиц с

СДС на фоне проводимого местного лечения

Глава 4.3.1. Иммуногистохимическая характеристика процессов репарации

на фоне терапии отрицательным давлением

На фоне проведенного лечения по данным иммуногистохимического исследования с антителами к маркеру макрофагов CD68 отмечено статистически значимое нарастание количества макрофагов в группе 1: медиана количества макрофагов на фоне лечения составила 20[15;30], $p = 0.023$. В группе 3 прирост количества макрофагов (до 15 [10;20]) был статистически недостоверным – $p = 0.19$. Данные различия между группами были статистически значимыми, $p = 0.01$.

В ходе лечения отмечается значительное увеличение количества новообразованных сосудов по данным окраски CD31: в группе 1 до лечения количество сосудов составляло 46[33;66], после лечения – 101 [75;189], $p = 0.01$. В группе 3 до терапии - 58[30;95], после - 97[56;157], $p = 0.03$. Несмотря на то, что видна более выраженная тенденция прироста новообразованных сосудов, статистически значимых различий между группами не отмечено – $p = 0.33$.

В обеих группах выявлено снижение экспрессии MMP-9 после лечения, в группе 1 отмечалась тенденция к более выраженному снижению активности данной коллагеназы: до терапии - 3[2;4], после - 1[1;3], $p < 0.01$. в контрольной группе до лечения - 4[2;4], после - 3[2;3], $p = 0.018$. Однако, различия между группами не были статистически значимыми, $p = 0.38$.

В ходе лечения зафиксировано увеличение экспрессии TIMP-1: в группе 1 – до лечения 1[1;2], после медиана уровня TIMP-1 составила 2[2;3], $p = 0.009$. В группе больных, получавших стандартное местное лечение, медиана данного показателя до начала терапии равнялась 2[1;3], после - 3[2;4], $p = 0.09$. Несмотря на более выраженную тенденцию прироста TIMP-1 после терапии отрицательным

давлением, различия между группами были статистически недостоверны - $p = 0.74$.

При проведении ИГХ с АТ к остеопонтину выявлено увеличение экспрессии данного маркера на фоне терапии отрицательным давлением в большей степени: до лечения 3[2;3], после - 4[3;4], $p = 0.005$. После проведенной стандартной терапии выраженность иммунореактивности остеопонтина также увеличилась до 4[3;4] (исходно - 3[2;4],), однако изменения были недостоверны - $p = 0.28$, что, скорее всего, обусловлено малым объемом выборки. Таким образом, различия между группами также были статистически незначимыми – $p = 0.84$.

4.3.2. Иммуногистохимические особенности репаративных процессов мягких тканей нижних конечностей на фоне терапии коллаген-содержащими повязками

По результатам иммуногистохимического исследования группах коллаген-содержащих повязок и стандартного лечения исходно отмечалась экспрессия маркера макрофагов (CD68) и матричной металлопротеазы-9 средней выраженности, экспрессия TIMP-1 была слабой ($p > 0.05$).

На фоне проведенного лечения по данным иммуногистохимического исследования с антителами к маркеру макрофагов CD68 отмечено статистически значимое нарастание количества макрофагов в группе 2: до лечения медиана количества макрофагов составила 15 [5;20], после - 25[10;40], $p = 0.018$. В то время как в группе 3 прирост количества макрофагов (до 15 [10;20]) был статистически недостоверным – $p = 0.19$. Различия между группами не были статистически значимыми, $p = 0.06$.

При подсчете сосудов (с помощью ИГХ с АТ к CD31) на фоне проводимого лечения выявлено практически двукратное увеличение количества сосудов в группе 2: до терапии – 43[19;62], после 84 [50;109] $p = 0.006$, в то время как в контрольной группе данные показатели до терапии равнялись 58[30;95], после - 97[56;157], $p = 0.03$. Различия между группами были статистически незначимыми, $p = 0.26$.

В обеих группах выявлено снижение экспрессии MMP-9 после лечения, в группе 2 отмечалась тенденция к более выраженному снижению активности данной коллагеназы: уровень MMP снизился до 2[2;3] (исходно - 4[3;4]) , $p = 0.007$, в группе 3- 3[2;3] (исходно - 4[2;4]), $p = 0.018$. Однако, различия между группами не были статистически значимыми, $p = 0.38$.

Динамика увеличения активности TIMP-1 на фоне терапии в обеих группах была статистически недостоверной: в группе 2 – до лечения - 1[1;2], после - 2[2;3],

$p=0.64$, в группе 3 до терапии - 2[1;3], после - 3[2;4] $p = 0.09$. группы также не различались между собой результатами активности TIMP на фоне лечения – $p=0.34$.

При проведении ИГХ с АТ к остеопонтину выявлено увеличение экспрессии данного показателя на фоне терапии коллагеном в большей степени по сравнению с группой 3: до лечения 3[3;3], после - 4[3;4], $p = 0.002$. На фоне стандартной терапии выраженность экспрессии остеопонтина также увеличилась - 4[3;4] (исходно - 3[2;4]), $p = 0.28$. Различия между группами не были статистически достоверны - $p = 0.54$.

Глава 4.5. Влияние различных факторов на процессы заживления ран нижних конечностей у лиц с синдромом диабетической стопы

Был проведен анализ влияния сопутствующих заболеваний на скорость заживления раневых дефектов.

Как видно из таблицы 8, достоверных различий в процессах заживления у лиц без тяжелых сопутствующих заболеваний и с их наличием зафиксировано не было.

Таблица 8. Влияние наличия сопутствующих заболеваний на исходы заживления.

| Показатель | Тяжелые заболевания есть, n=35 | Тяжелых заболеваний нет, n=28 | p-value |
|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------|
| Разница площади ран | 18,6[9,9;30,3] | 26,2[13,4;34,6] | 0,116430 |
| Разница глубины ран | 30,4[16,6;54,5] | 28,9[15,7;40,9] | 0,538207 |

Корреляций между значениями гликированного гемоглобина, а также других лабораторных показателей крови (гемоглобин, белок общ, СКФ) и разницей глубины и площади на фоне всех видов лечения получено не было. Коэффициент корреляции варьирует от -0.02 до 0.02.

В ходе корреляционного анализа отмечено влияние активности TIMP-1 на глубину ран. Так, при большей активности данного показателя на фоне лечения у всех больных, глубина ран была меньше, коэффициент корреляции r (по Спирмену) = -0.19.

Обращает на себя внимание корреляционная зависимость между экспрессией ММР и фазой раневого процесса, коэффициент корреляции r (по Спирмену) = -0.21. Таким образом, наибольшая экспрессия ММР определялась в начальных фазах раневого процесса, а именно в фазе воспаления.

Кроме того, зафиксирована корреляционная связь между значениями TIMP-1 и выраженностью отека, коэффициент корреляции $r_s = -0.21$.

Таким образом, выраженность отека зависела от значений TIMP-1: при повышении экспрессии данного ингибитора ММР, выраженность отека уменьшалась.

Глава 5. Обсуждение

Хронические раневые дефекты нижних конечностей при сахарном диабете в настоящий момент встречаются все чаще. Это обусловлено различными факторами, в том числе и растущей заболеваемостью СД.

Хорошо известно, что процессы заживления при нарушенном углеводном обмене замедлены, однако патофизиологические основы данного факта до конца не ясны. В настоящее время существует стандартизованный подход к местному лечению различных форм синдрома диабетической стопы, однако единой концепции и понимания молекулярно-клеточных механизмов воздействия его составляющих до сих пор не выработано.

Основными принципами лечения хронических ран при сахарном диабете, согласно рекомендациям международной рабочей группы по изучению диабетической стопы IWGDF 2015 являются: устранение избыточного давления в области поражения стопы, восстановление артериального кровотока, контроль инфекции, компенсация углеводного обмена и сопутствующих заболеваний, местное лечение, обучение пациентов правилам ухода за ногами, профилактика рецидивов [69].

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния различных методов местного воздействия на репарацию тканей у больных с синдромом диабетической для оптимизации тактики и повышения эффективности лечения язвенных дефектов стоп у данной категории пациентов.

Было проведено комплексное обследование 63 пациентов с синдромом диабетической стопы от 32 до 78 лет, находившихся на стационарном лечении в отделении диабетической стопы в ФГБУ Эндокринологический центр МЗ РФ в период с сентября 2012 года по декабрь 2014 года.

Основными принципами лечения синдрома диабетической стопы являлись: разгрузка пораженной нижней конечности, обработка раневого дефекта,

обеспечение достаточного кровотока, контроль инфекции и состояния углеводного обмена [28].

Всем пациентам была проведена хирургическая обработка раневого дефекта, проводилась требуемая антибактериальная терапия и разгрузка нижних конечностей. Антибактериальные препараты назначались с целью профилактики вторичного инфицирования ран, которое возможно при смене повязок.

В период стационарного лечения всем пациентам проводилась коррекция сахароснижающей терапии с достижением индивидуальных целевых значений гликемии [1]. Методом случайной выборки больные были распределены в группы периоперационного лечения: первую группу составляли больные, получавшие терапию отрицательным давлением, вторую группу – пациенты, которым проводилось местное лечение коллаген-содержащими повязками, третью (контрольную) – группа лиц, получавшие стандартную терапию атравматическими повязками.

Учитывая разные механизмы действия выбранных методов местного лечения, группы 1 и 2 между собой не сравнивались.

В ходе обследования было установлено, что все включенные в исследование больные были сопоставимы по возрасту, контролю углеводного обмена, выраженности микрососудистых осложнений, состоянию артериального кровотока нижних конечностей, площади и глубине раневых дефектов, а также выраженности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей по данным световой микроскопии и иммуногистохимического анализа ($p > 0.05$).

В ходе клинико-лабораторного обследования выяснено, что средний уровень гликированного гемоглобина у всех больных составлял $8,85 \pm 1,68\%$, таким образом, состояние углеводного обмена было неудовлетворительным.

В исследовании Christman et al., было установлено, что скорость заживления ран нижних конечностей при диабете напрямую зависела от уровня гликированного гемоглобина. При значениях $HbA1c \leq 7\%$ скорость заживления составляла 0.197 см^2 в день, при $HbA1c$ 7-8% раневые дефекты уменьшались в размерах со

скоростью 0.157 см^2 в день, а при $\text{HbA1c} \geq 8\%$ заживление происходило со скоростью 0.028 см^2 в день [41].

Однако, по данным исследования UKPDS, несмотря на зафиксированную связь между снижением гликированного гемоглобина и сокращением рисков развития микрососудистых осложнений, сердечно-сосудистых катастроф и смертности, ассоциации между риском проведения ампутации нижних конечностей и интенсивностью гликемического контроля выявлено не было [121]. Исследование DCCT также подтверждает отсутствие влияния гликемического контроля на частоту проведения высоких ампутаций нижних конечностей [21].

Обследованные больные были сопоставимы по полу, возрасту, значениям липидного профиля и другим лабораторным показателям крови, а также выраженности микрососудистых осложнений.

Так, у большинства больных диабетическая нефропатия либо отсутствовала, либо была на стадии МАУ, таким образом, фактор дефицита белка как неблагоприятный для заживления тканей отсутствовал, что подтверждено лабораторными данными.

У большинства больных имелась диабетическая полинейропатия. Несмотря на то, что при оценке периферической чувствительности у незначительного количества больных не было выявлено ее снижения, однако, наличие у обследованных сухости кожных покровов, гиперкератозов и дисгидроза позволило расценить вышеуказанные симптомы как начальные проявления снижения периферической иннервации.

Согласно лабораторным исследованиям крови, пациенты трех групп также были сопоставимы по значениям общего и биохимического анализов крови. Данных об остром воспалительном процессе не получено.

Обращает на себя внимание ускорение СОЭ у большинства больных, что, наиболее вероятно, обусловлено длительно текущим хроническим раневым процессом.

Отмечено отличие в данных липидного профиля между группами 2 и 3. Несмотря на то, что данные показатели статистически различались, в целом видна

тенденция отсутствия достижения целевых значений ЛПНП и общего холестерина у всех обследованных больных. Это может быть как результатом отсутствия компенсации углеводного обмена, а также являться одним из неблагоприятных факторов, влияющих на заживление.

Однако, согласно исследованию Adler et al, пол, возраст, расовая принадлежность, курение, ИМТ, липиды крови, артериальное давление (АД), ЧСС, температура тела, количество лейкоцитов в крови и диабетическая нейропатия не влияли на скорость заживления [21].

Обращает на себя внимание тот факт, что в текущем исследовании корреляции между значениями гликированного гемоглобина и скоростью заживления выявлено не было. Кроме того, остальные лабораторные показатели также не оказывали влияния на репаративные процессы мягких тканей.

В ходе клинического обследования состояния раневых дефектов было установлено, что пациенты были сопоставимы по размерам и глубине ран.

Учитывая то, что всем больным до начала местного лечения была проведена хирургическая обработка, а также проводилась антибактериальная терапия, наличие раневой инфекции было исключено.

Больные были сопоставимы по глубине ран согласно классификации Wagner. Так, в исследование были включены больные с глубокими язвенными дефектами, но без гангрены и остеомиелитического процесса.

По результатам проведенного лечения длительностью 9 ± 2 дня выявлено существенное различие в динамике площади и глубины ран на фоне терапии отрицательным давлением по сравнению со стандартной терапией и при сравнении результатов применения терапии коллагеном со стандартным лечением.

Так, на фоне лечения вакуумом площадь раневых дефектов сократилась на 19.8 см^2 [10.0; 37.1], после применения коллаген-содержащих повязок на 26.4 см^2 [11.7; 32.4], а в ходе стандартного лечения на 17.0 см^2 [13.3; 26.7]. Несмотря на то, что различия между группами были недостоверными ($p > 0.05$), имеется четкая

тенденция к более выраженному сокращению площади раны в первой группе. Площадь ран уменьшилась на 19,8% [10;37.7] в группе 1, 26.4 % [11.7; 32.4] – в группе 2, 17.0% [13.3; 26.7] – в группе 3. Различия между группами 1 и 2 по сравнению со стандартным лечением недостоверны, $p > 0.05$.

Глубина раневых дефектов на фоне лечения сократилась на 42.8% [24.3;60.0] в группе вакуум-терапии, на 30.4% [20.0; 41.1] – в группе коллаген-содержащих повязок, на 16.6% [12.5; 32.2] – в контрольной группе. Различия группы 1 и 2 со стандартным лечением достоверны.

Обращает на себя внимание тот факт, что терапия отрицательным давлением более эффективно влияла на глубину ран, чем на значения их площади.

В то время, как терапия коллагеном наиболее эффективно влияла на сокращение площади ран, но не глубины.

Схожие данные встречаются как в отечественных работах [11; 12], где было показано, что терапия отрицательным давлением напрямую снижала размеры раны, независимо от интенсивности клеточной пролиферации, так и зарубежных, где на фоне применения отрицательного давления у пациентов с СД после проведения малых ампутаций значительно сокращалась площадь и глубина раневых дефектов [117].

Аналогичный опыт получен другими исследователями при местном применении коллаген-содержащих повязок. Lobman et al. в ходе своего исследования также отметил сокращение размеров ран у лиц с СДС на 16% на фоне применения коллаген-содержащей повязки Promogran по сравнению со стандартной терапией, где язвы уменьшились на 1.65% [82].

Kakagia et al. продемонстрировал большую эффективность повязок на основе коллагена по сравнению с местным лечением факторами роста у лиц сахарным диабетом и раневыми дефектами нижних конечностей [74]

Таким образом, можно сделать вывод о том, что как вакуум-терапия, так и применение коллаген-содержащих повязок более эффективно влияет на клинические параметры заживления, чем стандартное местное лечение.

Учитывая тот факт, что терапия отрицательным давлением эффективно сокращает глубину ран после проведенной хирургической обработки, а местное применение коллагена улучшает параметры площади, можно заключить, что применение вакуума является приоритетным у пациентов с глубокими раневыми дефектами и обильной экссудацией.

Крайне важным условием хорошего заживления является достаточное кровоснабжение тканей нижних конечностей.

Критерием невключения в исследования являлось наличие критической ишемии нижних конечностей.

Транскутанная оксиметрия признается более информативным маркером заживления по сравнению с подсчетом лодыжечно-плечевого индекса и доплерометрией [103].

При обследовании было выяснено, что среднее значение $tcrO_2$ у всех больных составляло 43.8 ± 9.4 мм рт.ст., что свидетельствует о состоятельном артериальном кровотоке в пораженной конечности и отсутствии критической ишемии у обследованных.

На фоне проводимого местного лечения зафиксирован достоверный прирост парциального давления кислорода в группе 1: медиана $tcrO_2$ после лечения - 52 мм рт.ст. [48;58] (исходно - 46 [38;52]), $p < 0.01$, значения $tcrO_2$ в группе 2 - 48 [45;53] мм.рт.ст. (до лечения - 47 [41; 51] мм.рт.ст.), $p = 0,18$, в группе 3 - 39 [32;47], (до терапии - 43[38;47] мм.рт.ст.), $p = 0,017$. При сравнении результатов лечения групп 1 и 2 с контрольной были выявлены достоверные различия в полученных результатах ($p < 0.001$ и $p = 0.02$ соответственно).

Таким образом, можно говорить о том, что терапия отрицательным давлением значительно усиливает локальную микроциркуляцию, что согласуется с данными Morykwas et al. и Timmers, в чьих работах показано усиление местного кровотока на фоне терапии отрицательным давлением [77; 120]. Это значительно улучшает репаративные процессы, увеличивает скорость заживления, а также способствует более эффективному действию медикаментозной терапии, так как с

интенсификацией местного кровоснабжения улучшается доставка антибактериальных препаратов в рану.

Подобный эффект описан рядом авторов, в том числе и в отечественной литературе [4].

В работе Wollina описано усиление локального кровотока после терапии коллагеном (повязкой Promogran) у лиц с венозными язвами [107], что не нашло подтверждения в нашем исследовании.

Обращает на себя внимание незначительное уменьшение локальной микроциркуляции на фоне стандартного лечения, что может быть обусловлено погрешностью метода и сохраняющимся посттравматическим отеком окружающих тканей.

Болевой синдром у пациентов с хроническими ранами стоп является крайне неблагоприятным фактором заживления. Он снижает как качество жизни больных и их приверженность лечению, так и может приводить к замедлению репаративных процессов.

Стоит отметить, что до начала терапии у большинства пациентов болевой синдром был умеренно выражен в результате имеющейся полинейропатии. На фоне лечения во всех группах зафиксирован регресс боли.

Отмечена более выраженная тенденция к снижению интенсивности болевых ощущений на фоне терапии отрицательным давлением и местного применения коллагена по сравнению со стандартным лечением ($p < 0.05$).

Безусловно, это может быть следствием как уменьшения воспаления на фоне комплекса проводимых лечебных мероприятий, так и непосредственным влиянием местного лечения.

Интересно, что никто из больных, включенных в исследование, не отказался от продолжения терапии отрицательным давлением по тем или иным причинам (неудобство, шум, страх и пр.). Этому способствовало и отсутствие неприятных болевых ощущений на фоне проводимого местного лечения.

Кроме того, возможно, уменьшение интенсивности болевого синдрома на фоне вакуум-терапии обусловлено более редкой, по сравнению с другими использованными методами, сменой повязки, а также уменьшением площади поврежденных тканей.

Полученные данные согласуются с результатами исследования Stansby et al., в котором пациенты также отмечали уменьшение болевого синдрома на фоне терапии отрицательным давлением и не испытывали никакого дискомфорта в ходе лечения [117].

На фоне местного применения коллагена также отмечено уменьшение болевого синдрома по сравнению со стандартной терапией.

Аналогичный опыт был описан в работе Wollina et al., где на фоне применения коллаген-содержащих повязок в течение недели выраженность болевого синдрома достоверно уменьшалась у пациентов с венозными язвами [131].

В ходе гистологического исследования биоптатов раневых дефектов до лечения было установлено, что все раны были сопоставимы по состоянию репаративных процессов в мягких тканях. У всех больных отмечался выраженный отек, плохо организованный экстрацеллюлярный матрикс, низкое содержание фибробластоподобных клеток и значительный воспалительный инфильтрат ($p > 0.05$). Все раны находились в фазе воспаления.

Полученные данные согласуются с данными Boulton et al., где было доказано, что раны при диабете имеют более продолжительную фазу воспаления, сниженную активность воспалительных клеток и замедленную перестройки ЭЦМ. Именно эти нарушения препятствуют заживлению и способствуют переходу раны из острой в хроническую [37].

Согласно работам Baltzis, взаимодействие гликированного коллагена с ЭЦМ и фибробластами или эндотелиальными клетками препятствует адгезии клеток, их пролиферации и сокращению раны [28].

На фоне лечения в группе 1 и 2 удалось достичь более выраженной тенденции к уменьшению межклеточного отека по сравнению с группой контроля, однако полученные различия были статистически недостоверны.

Динамики изменений организации ЭЦМ в результате того или иного метода местного лечения получено не было. Возможно, это объясняется затруднительной оценкой данного параметра при окраске гематоксилин-эозином.

По данным световой микроскопии биоптатов раневых дефектов в группах вакуум-терапии и коллаген-содержащих повязок зафиксирован переход грануляционной ткани от молодой к зрелой, в то время как в контрольной группе грануляционная ткань имела характер созревающей.

Однако, на фоне терапии отрицательным давлением данный переход был статистически достоверен по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$), а в группе коллаген-содержащих повязок, различий с контрольной группой получено не было ($p = 0.28$).

Кроме того, данные морфологической картины демонстрируют достоверный процесс перехода ран из фазы воспаления в фазу эпителизации во всех обследованных группах, однако статистически значимых различий между группами не отмечено.

Схожие данные описаны в работе Bassetto et al., в которой исследователи отмечают уменьшение отека, организацию ЭЦМ и уменьшение воспалительного инфильтрата на фоне терапии венозных язв отрицательным давлением [32].

На рисунке 20 представлена гистологическая картина биоптатов ран на фоне проводимого местного лечения.

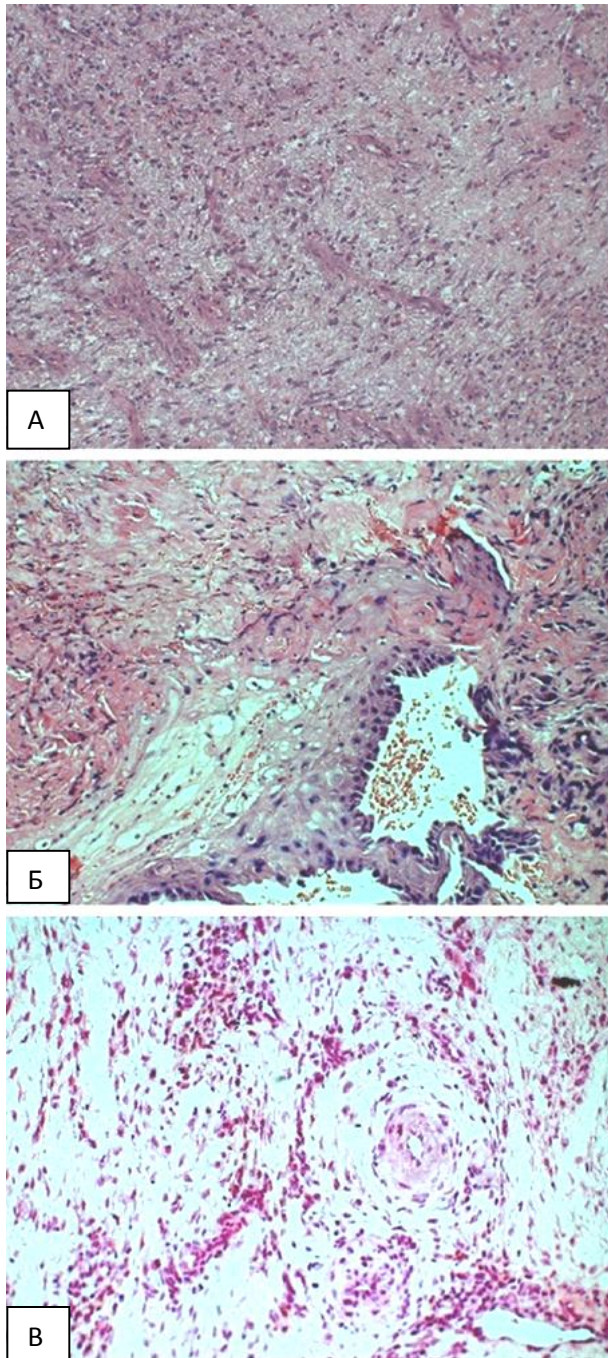


Рисунок 20. Гистологическая картина биоптатов ран после лечения (гематоксилин-эозин, x200).

А. Гистологическая картина биоптата раневого дефекта на фоне терапии отрицательным давлением: уменьшение воспалительного инфильтрата, отека. Организация ЭЦМ. Появление зрелой грануляционной ткани.

Б. Световая микроскопия биоптата раны после терапии коллаген-содержащими повязками. Появление эпителизации. Мезенхимально-эпителиальный переход.

В. Гистологическая картина раневого дефекта на фоне стандартного лечения. Сохраняется межклеточный отек, присутствуют клетки воспаления.

При иммуногистохимическом исследовании также было отмечено замедление репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у обследованных больных с СД.

Зафиксировано замедление неоангиогенеза до начала терапии. При подсчете количества сосудов, окрашенных с помощью маркера эндотелиальных клеток CD31, отмечено небольшое количество сосудов на единицу площади. Так, среднее количество сосудов в биоптатах ран до лечения составляло 57 ± 43 на 1 мм., что также говорит о замедлении процессов репарации у обследованных лиц до начала местного лечения.

На фоне проводимой терапии в группе 1 отмечен наибольший прирост количества сосудов, окрашенных с помощью АТ к CD31: медиана количества сосудов на единицу площади составляла 101 [75; 189], $p < 0.001$. Полученные данные согласуются и с результатами транскутанной оксиметрии, где было зафиксировано существенное усиление локальной микрогемодинамики после лечения. Данные результаты свидетельствуют об интенсивно протекающих репаративных процессах в мягких тканях и могут служить маркером хорошего заживления.

На рисунке 21 отражена иммуногистохимическая картина окрашивания эндотелия сосудов с помощью АТ к CD31 на фоне проводимой местной терапии.

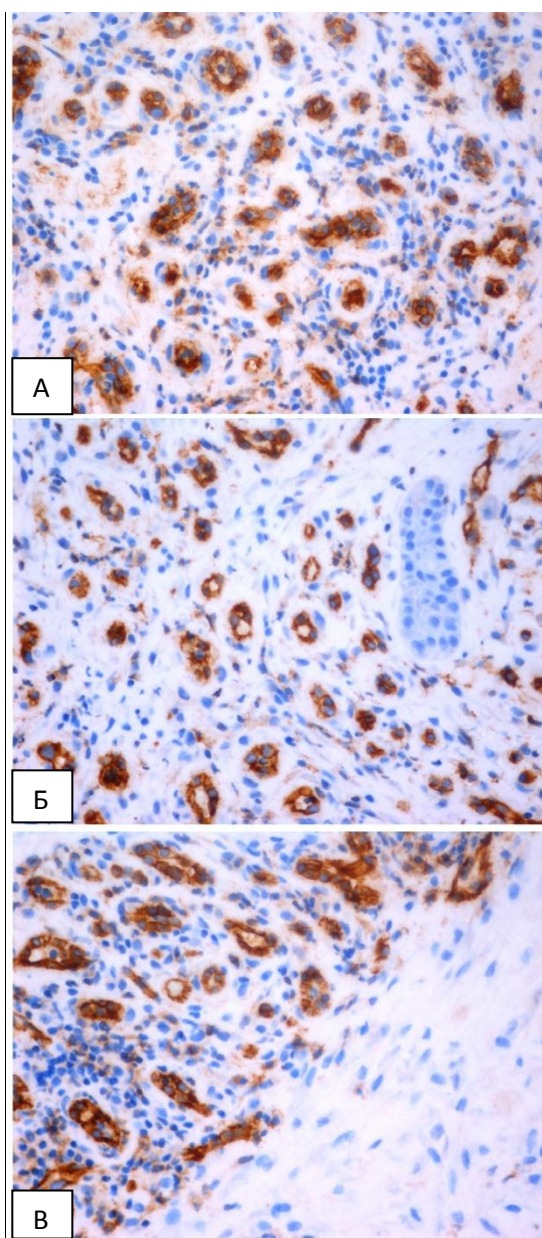


Рисунок 21. Окрашивание эндотелия новообразованных сосудов с помощью антител к CD31 на фоне различных методов местного лечения (x200).

А. На фоне терапии отрицательным давлением

Б. После лечения коллаген-содержащими повязками

В. На фоне стандартного лечения

Полученные данные схожи с результатами Bassetto et al., где был отмечен почти шестикратный прирост количества сосудов через 20-24 дня применения вакуум-терапии [32].

В группе 2 также выявлено увеличение количества сосудов: медиана после лечения составляет 84 [50;109] на единицу площади, что также является свидетельством перехода раневого процесса в фазу эпителизации.

В группе контроля также отмечено нарастание количества формирующихся сосудов: медиана их количества после лечения 97 [56; 157]. Однако, достоверных различий между группами получено не было.

В ходе настоящего исследования установлено, что уровень экспрессии остеопонтина был снижен у большинства больных. Это согласуется с данными Vaughan EE et al., в которых говорится снижении экспрессии остеопонтина у лиц с нарушениями углеводного обмена [122].

Высказывается предположение, что одной из причин замедления репаративных процессов при сахарном диабете является снижение экспрессии остеопонтина в раневом ложе, что выражается в нарушении миграции иммунокомпетентных клеток, накоплении продуктов распада, уменьшении количества эндотелиальных клеток, замедлении неоангиогенеза и дезорганизации ЭЦМ [122].

На фоне лечения отмечается увеличение экспрессии OPN в группах 1 и 2.

При сравнении полученных результатов с данными контрольной группы, статистически достоверных различий не получено. Во всех группах отмечена тенденция к повышению экспрессии данного маркера заживления, что также является критерием хорошего заживления ран.

На рисунке 22 представлена иммуногистохимическая картина биоптатов ран, отражающая выраженность экспрессии остеопонтина на фоне проводимого лечения.

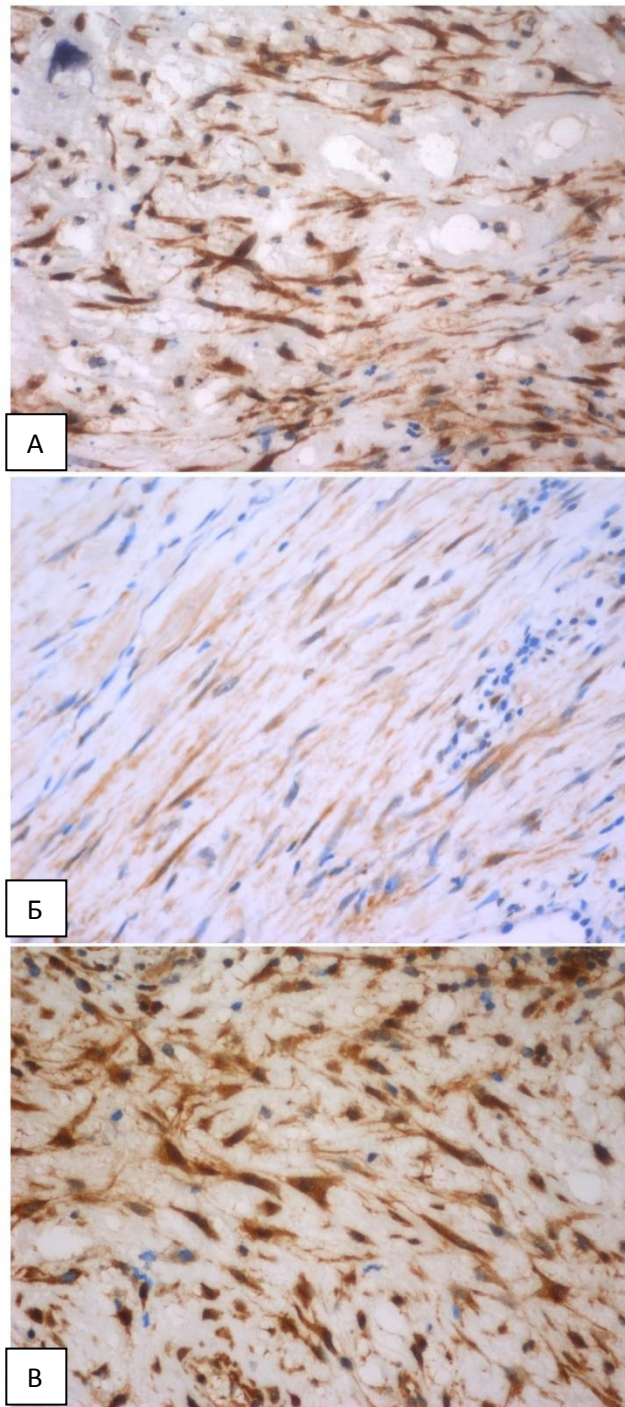


Рисунок 22. Иммуногистохимическая картина окрашивания биоптатов ран с помощью антител к остеопонтину после лечения (x400).

А. На фоне терапии отрицательным давлением. Окраска фибробластов и фиброцитов. Зрелая соединительная ткань.

Б. После терапии коллаген-содержащими повязками. Определяются волокна формирующейся соединительной ткани, фиброциты и фибробласты.

В. На фоне стандартного лечения. Окрашивание преимущественно фибробластов.

У всех больных до лечения отмечается окрашивание средней интенсивности маркера макрофагов CD68.

На лабораторных моделях было доказано, что при СД количество макрофагов в ране накапливается более длительно, что может быть связано с повышением уровня провоспалительных цитокинов и протеаз и сниженным количеством факторов роста. Аналогичные данные получены и у пациентов с сахарным диабетом [34].

На фоне лечения в группах 1 и 2 отмечено значимое увеличение количества макрофагов при окраске АТ к CD68. Однако, в контрольной группе данный прирост их количества не был достоверным. При сравнении полученных результатов имеются статистические различия между группой 1 и 3, $p=0.01$, при сравнении групп 2 и 3 аналогичных данных не зафиксировано: $p=0.06$ Таким образом, можно утверждать, что вакуум-терапия эффективно влияет на увеличение количества альтернативно-активированных макрофагов (судя по их фенотипу), что также является показателем перехода раневого процесса в стадию ремоделирования.

На рисунке 23 отражена иммуногистохимическая картина макрофагов, окрашенных с помощью АТ к CD68 после лечения.

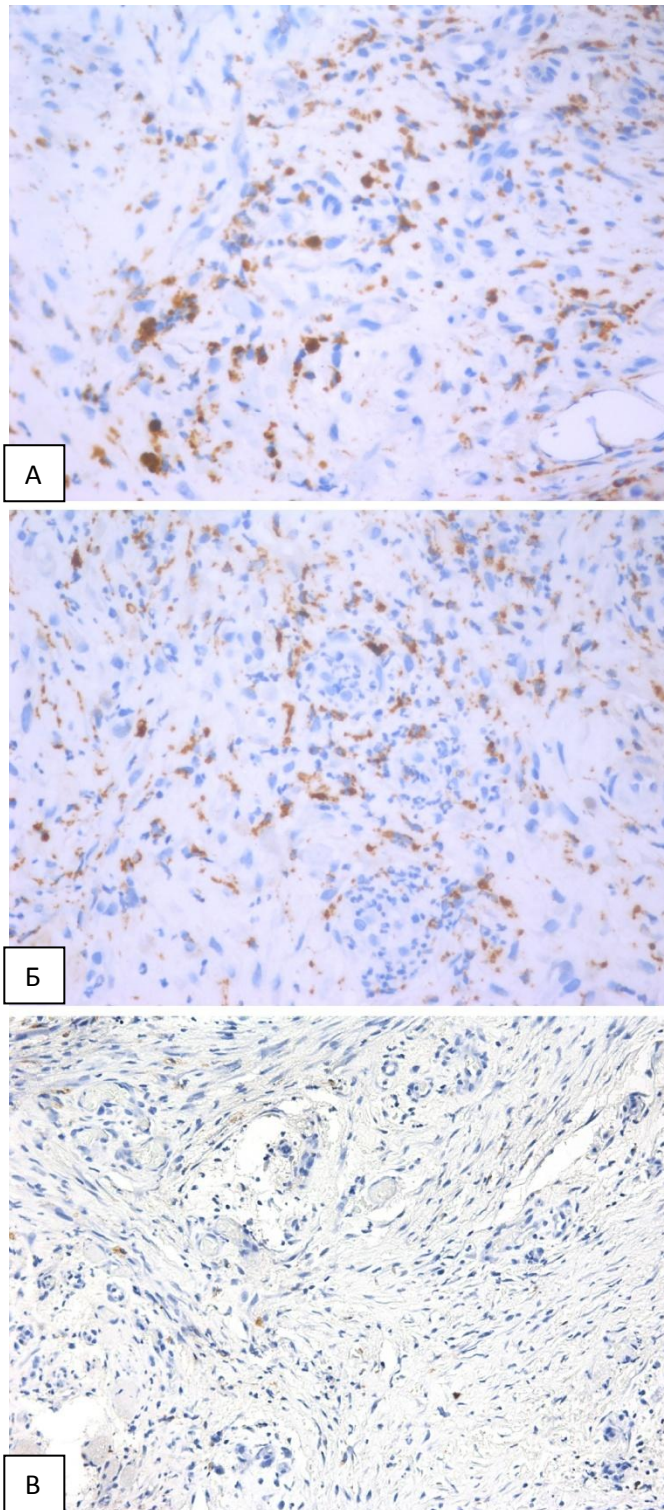


Рисунок 23. Иммуногистохимическая картина окрашивания макрофагов с помощью антител к CD68 после лечения (x400)

А. Прирост количества макрофагов на фоне терапии отрицательным давлением.

Б. Увеличение количества макрофагов после лечения коллаген-содержащими повязками

В. После стандартной терапии определяются единичные макрофаги

До лечения зафиксировано усиление экспрессии ММР-9 и слабое окрашивание TIMP-1, что свидетельствует о высокой протеолитической активности в ранах и, согласно некоторым исследованиям, приводит к замедлению перестройки коллагена и является неудовлетворительным прогностическим признаком заживления ран.

Так, Liu et al. отметили, что высокий уровень ММР-9 в раневой жидкости свидетельствует о воспалении и является маркером плохого заживления ран при сахарном диабете [81]. Другие исследователи в своей работе предложили использовать соотношение ММР-9/TIMP-1 в качестве предиктора заживления ран при синдроме диабетической стопы [97].

На фоне лечения во всех группах отмечено снижение экспрессии ММР-9 и усиление экспрессии TIMP-1.

В группе 1 зафиксировано значимое снижение ММР-9 ($p < 0.01$) и увеличение TIMP-1 ($p = 0.009$) на фоне лечения. Данный эффект объясняется некоторыми авторами возможностью вакуума удалять экссудат с провоспалительными цитокинами и протеазами [11].

В группе 2 получен схожий результат: ММР-9 в ходе терапии коллагеном существенно снизился ($p = 0.007$), несмотря на тенденцию к увеличению TIMP, данные были недостоверны $p = 0.064$. аналогичные данные получены в исследовании Мыскиной Н.А., где было показано, что снижение уровня активности матриксных металлопротеаз более, чем в 2 раза свидетельствует о положительной динамике репаративных процессов у больных с СДС и хроническими трофическими ранами. Отсутствие изменений или увеличение количества желатиназ указывает на замедление эпителизации [10].

Подобный эффект достигается способностью коллагена, входящего в состав повязки, вступать в конкурентное взаимодействие с собственным коллагеном раны во взаимодействии с протеолитическими ферментами [45].

В контрольной группе также достоверно снижалась экспрессия ММР-9, $p = 0.018$, TIMP - без статистически значимой динамики: $p = 0.09$.

На рисунках 24 и 25 изображена иммуногистохимическая картина экспрессии MMP-9 и TIMP-1 на фоне проводимого лечения.

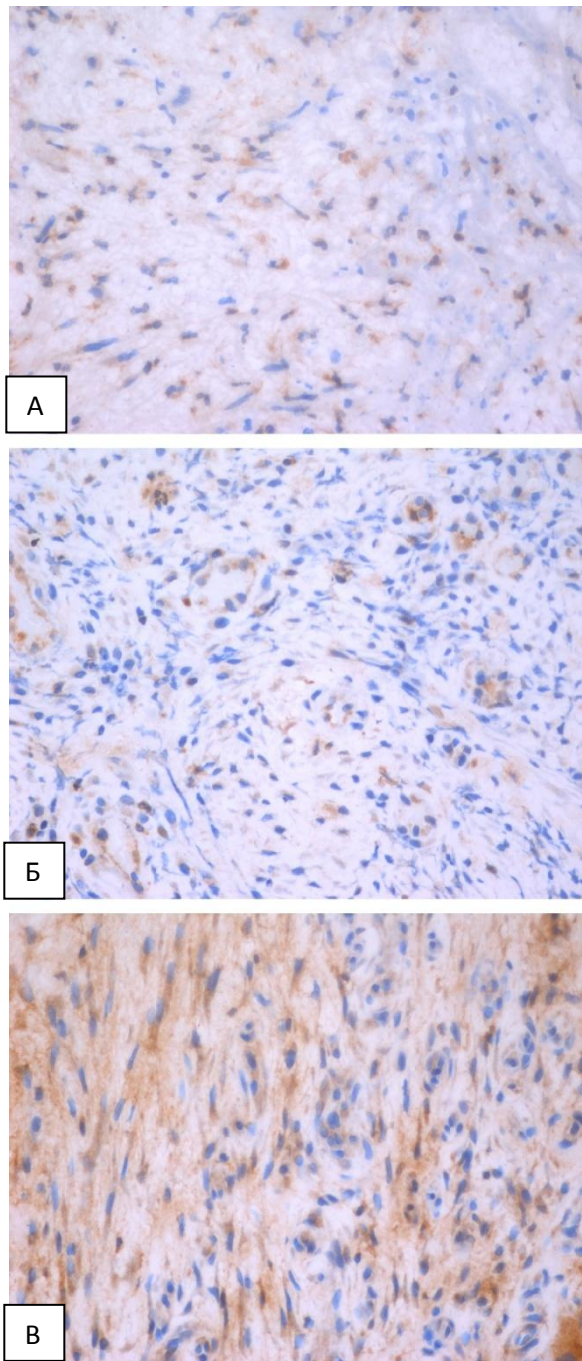


Рисунок 24. Иммуногистохимическая картина экспрессии MMP-9 на фоне лечения (x400).

- А. Слабо выраженная экспрессия MMP-9 на фоне терапии отрицательным давлением.
- Б. Слабо выраженная экспрессия MMP-9 после применения коллаген-содержащих повязок
- В. Сохранение выраженной экспрессии MMP-9 на фоне стандартного лечения.

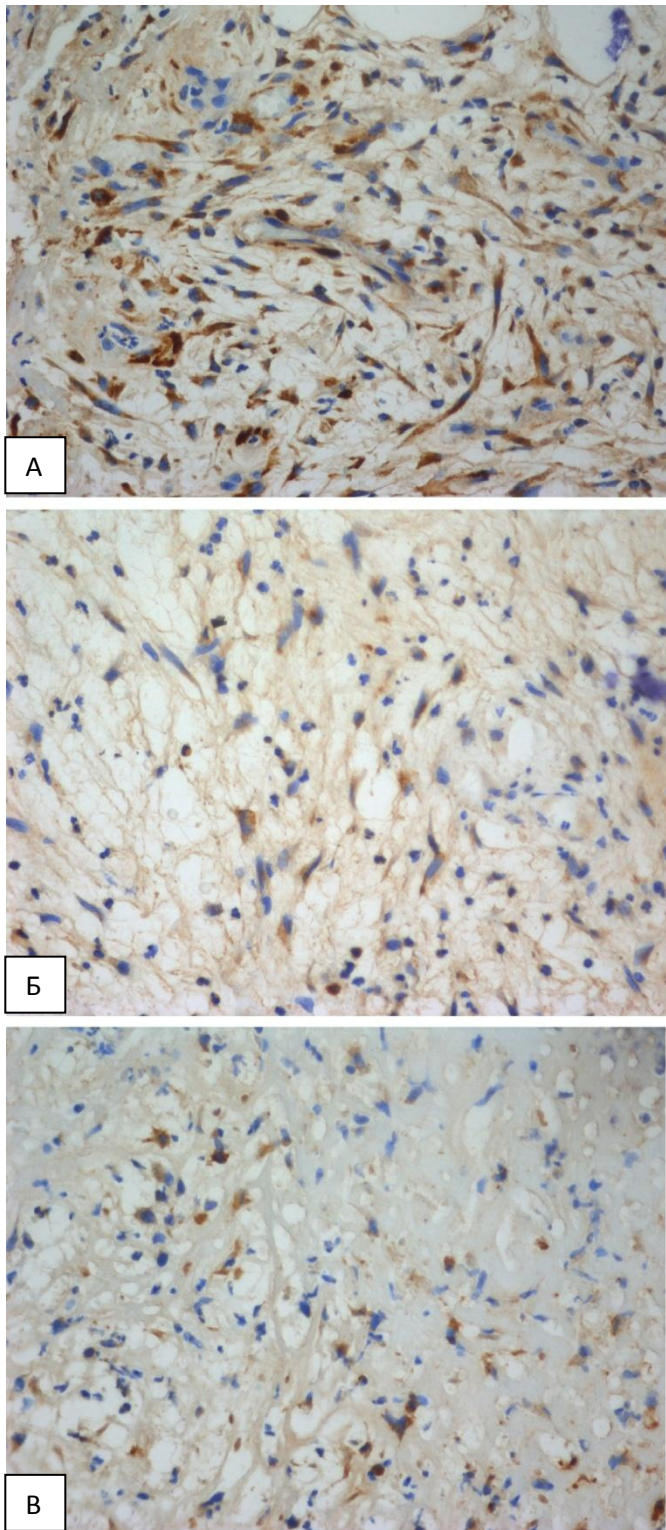


Рисунок 25. Иммуногистохимическая картина экспрессии TIMP-1 на фоне лечения (x400).

А. Выраженная экспрессия TIMP-1 на фоне терапии отрицательным давлением.

Б. умеренно выраженная экспрессия TIMP-1 после применения коллаген-содержащих повязок

В. Слабо выраженная экспрессия TIMP-1 на фоне стандартного лечения.

На основании анализа полученных данных о влиянии каждого из методов местного лечения ран на клинические и клеточные аспекты заживления, предложен алгоритм ведения пациентов с нейропатической и нейроишемической (без критической ишемии) формами СДС в периоперационном периоде, представленный на рисунке 26.

После проведенной хирургической обработки необходимо оценивать глубину и площадь раневого дефекта. Если послеоперационная рана чистая, отсутствуют признаки воспаления и вторичные некрозы, а также раневой дефект имеет достаточный объем и экссудацию, приоритетным является использование терапии отрицательным давлением с целью более быстрого формирования грануляционной ткани, сокращения размеров дефекта и подготовки раны к следующему этапу лечения.

В случае невозможности выполнения пластического закрытия местными тканями, рекомендуется ведение раны открытым способом до достижения заживления вторичным натяжением. В этом случае показано применение повязок на основе коллагена.



Рисунок 26. Алгоритм периоперационного ведения раневых дефектов после хирургической обработки у лиц с нейропатической и нейроишемической формами СДС.

Глава 6. Выводы

1. У лиц с сахарным диабетом репаративные процессы в мягких тканях замедлены, что выражается в наличии межклеточного отека, плохой организации ЭЦМ, снижении экспрессии остеопонтина и TIMP-1 и сниженном количестве макрофагов по данным окрашивания с АТ к CD68 по результатам гистологического и иммуногистохимического исследований.
2. Терапия отрицательным давлением и коллаген-содержащими повязками эффективно сокращает как площадь, так и глубину раневых дефектов после проведенной первичной хирургической обработки по сравнению со стандартным лечением ($p < 0.05$) у лиц с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы
3. Вакуум-терапия значительно улучшает показатели локальной микрогемодинамики по данным транскутанной оксиметрии по сравнению со стандартной терапией ($p < 0.001$)
4. Терапия отрицательным давлением и местное применение коллагена существенно ускоряют репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей у лиц с СДС по сравнению со стандартным лечением, что выражается в сокращении сроков перехода раневого процесса из фазы воспаления в фазу эпителизации по данным гистологического и иммуногистохимического исследования, которые выявляют снижение количества клеток воспалительного инфильтрата, уменьшение отека и организации экстрацеллюлярного матрикса и формирование зрелой грануляционной ткани, а также увеличение экспрессии маркера макрофагов CD68 и остеопонтина.
5. Успешный процесс заживления ран при синдроме диабетической стопы характеризуется увеличением количества новообразованных сосудов по данным ИГХ (окрашивание маркера эндотелия CD31) ($p < 0.05$)
6. Местное использование отрицательного давления и коллагена приводит к достоверному ($p < 0.05$) снижению уровня экспрессии матриксной

металлопротеазы-9 и тенденции к повышению синтеза тканевого ингибитора металлопротеаз – 1, что ведет к ускорению организации экстрацеллюлярного матрикса и формирования качественной грануляционной ткани

Глава 7. Практические рекомендации

1. Современные методы местного лечения (терапия отрицательным давлением, коллаген-содержащие повязки) после первичной хирургической обработки хронических ран должны использоваться дифференцировано в зависимости от объема раны и количества экссудата. Это позволит значительно улучшить терапевтический прогноз и сократит сроки лечения
2. Алгоритм ведения пациентов с раневыми дефектами стоп после хирургической обработки, включающий оценку состояния раны, количества и характера экссудата, транскутанного напряжения кислорода тканей позволит оптимизировать лечебный процесс и существенно сократить сроки пребывания больного в стационаре.
3. Определение таких иммуногистохимических маркеров как CD31, CD68, остеопонтин, а также MMP-9 и TIMP-1 позволяет точно оценить интенсивность репаративных процессов в мягких тканях у лиц с различными формами синдрома диабетической стопы и может быть рекомендовано в качестве модели оценки выраженности репарации при проведении клинических исследований.
4. Усиление локальной микрогемодинамики по данным транскутанной оксиметрии на фоне проводимого лечения является предиктором хорошего заживления ран и быть рекомендовано к широкому использованию.

Список принятых сокращений

- АД** – артериальное давление
- АСБ** – атеросклеротическая бляшка
- ГАБ** – глубокая артерия бедра
- ЗББА** – задняя большеберцовая артерия
- ИБС** – ишемическая болезнь сердца
- ИГХ** – иммуногистохимия
- ИМТ**–индекс массы тела
- ЛЖ** – левый желудочек
- ЛПВП** – липопротеиды высокой плотности
- ЛПНП** – липопротеиды низкой плотности
- МАУ** – микроальбуминурия
- МБА** – малоберцовая артерия
- ОБА** – общая бедренная артерия
- ОНМК** - острое нарушение мозгового кровообращения
- ПА** – подколенная артерия
- ПБА** – поверхностная бедренная артерия
- ПББА** – передняя большеберцовая артерия
- ПИКС** - постинфарктный кардиосклероз
- ПССП** – пероральная сахароснижающая терапия
- ПУ** – протеинурия
- СД** – сахарный диабет
- СДС** – синдром диабетической стопы
- СКФ** - скорость клубочковой фильтрации
- СОЭ** – скорость оседания эритроцитов
- ТАС** – тыльная артерия стопы
- ХБП** – хроническая болезнь почек
- ХВН** - хроническая венозная недостаточность
- ХЕ** – хлебные единицы

ХПН – хроническая почечная недостаточность

ХСН - Хроническая сердечная недостаточность

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

EGF – эндотелиальный фактор роста

FGF – фактор роста фибробластов

GM-CSF - колониестимулирующий фактор роста гранулоцитов и макрофагов

HbA1c – гликированный гемоглобин

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IL - интерлейкин

M1 – классически активированные макрофаги

M2 – альтернативно активированные макрофаги

MMP – матриксная металлопротеаза

NO – оксид азота

NPWT - negative pressure wound therapy, терапия отрицательным давлением

OPN - остеопонтин

PDGF – фактор роста тромбоцитов

SPG – стереофотограмметрия

tcpO₂ – транскутанное напряжение кислорода

TFGF – трансформирующий фактор роста

TIMP – тканевой ингибитор металлопротеаз

TNF α – фактор некроза опухоли α

TNP - topical negative pressure treatment, терапия локальным отрицательным давлением

VAC - vacuum-assisted closure, вакуум-ассистированная повязка

VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста

VeV – видеометрия

Список литературы

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 6-й выпуск под редакцией И.И. Дедова и М.В. Шестаковой. – М.: ФГБУ Эндокринологический научный центр, - 2013.
2. Аметов А.С.. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, - 2013. - 621-646 с.
3. Атлас диабета IDF. Шестое издание, 2014
4. Горюнов С.В., Абрамов И.С., Чапарьян Б.А., Егоркин М.А., Жидких С.Ю. Руководство по лечению ран методом управляемого отрицательного давления. - М.: Издательский дом «Русский врач», - 2013
5. Гурьева И.В. Возможности местного лечения диабетических поражений стоп// Русский медицинский журнал. – 2009. - №2. - 509 с.
6. Гурьева И.В. Факторы риска и профилактика синдрома диабетической стопы// Международный эндокринологический журнал. - 2008. - №6. - 10 с.
7. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. - М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011. - 367-378 с.
8. Зайцева Е.Л., Токмакова А.Ю. Вакуум-терапия в лечении хронических ран// Сахарный диабет. – 2012. - №3. –45-49 с.
9. Международное соглашение по диабетической стопе. Составлено международной рабочей группой по диабетической стопе. – М.: Берег. – 2000. – 96 с.
10. Мыскина Н.А. Клинико-лабораторные маркеры эффективности консервативной терапии трофических язв у больных сахарным диабетом. Дис. канд. мед. наук. - М., 2003. – 94-95 с.
11. Оболенский В.Н., Никитин В.Г., Семенистый А.Ю. Использование принципа локального отрицательного давления в лечении ран и раневой инфекции// Новые технологии и стандартизация в лечении осложненных ран. – М., 2011. – 66-70 с.

12. Оболенский В.Н., Семенистый А.Ю., Никитин В.Г., Сычев Д.В., Вакуум-терапия в лечении ран и раневой инфекции// РМЖ. – 2010. - №17. - 1064-1072 с.
13. Светухин А.М., А.Б.Земляной. Гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы// Consilium Medicum. – 2002. - Том 04. - №10.
14. Семенова Д.С. Дерматопатии при сахарном диабете: распространенность, особенности течения, терапевтические подходы. Дис. канд. мед. наук. - М., 2013. – 12-17 сс.
15. Страхова Г.Ю. Особенности клиники, диагностики и консервативного лечения больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы и диабетической нефропатии. Дис. канд. мед. наук. - М., 2008. – 109-112 сс.
16. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия: учебник. – 5-е изд. - М.: Литтерра, 2010. – 848 с.
17. Токмакова А.Ю., Страхова Г.Ю., Галстян Г.Р. Современная концепция ведения больных с хроническими ранами и сахарным диабетом// Сахарный диабет. – 2005. - №1. –42-48 с.
18. Удовиченко О.В., Грекова Н.М. Диабетическая стопа. М.: Практическая медицина, - 2010.
19. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации под редакцией Савельева В.С. и соавт.ю – М.: ООО «Боргес», 2009. -60 с.
20. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MWJ, Appleton I, Kairsingh S, Jude EB, Jones K, McCollum CN, Ireland GW. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers// J Pathol. – 2000. – Vol.191. – P.434–442.
21. Adler A., Erqou S., Lima T., Robinson A. Association between glycated haemoglobin and the risk of lower extremity amputation in patients with diabetes mellitus—review and meta-analysis //Diabetologia. – 2010. - Vol.53. –P.840–849.
22. Airola K., Karonen T., Vaalamo M. et al. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas// Br. J. Cancer. – 1999. - Vol.80. – P.733-743.

23. Armstrong D.G. The University of Texas diabetic foot classification system// Ostomy wound manage. – 1996. – Vol.42. - P.60-61.
24. Armstrong D.G., Lavery L.A. Diabetic foot study consortium. Negative pressure wound therapy after partial diabetic foot amputation: multicentre, randomized control trial// Lancet. – 2005. – Vol.366(9498). – P.1704-1710.
25. Arnold F., West DC. Angiogenesis in wound healing// Pharmacol Ther. – 1991. - Vol.52. – P. 407–422.
26. Assadian O., Assadian A., Stadler M., Elschahawi M., Kramer A. Bacterial growth kinetic without the influence of the immune system using vacuum-assisted closure dressing with and without negative pressure in an in vitro wound model// Int Wound Journal. – 2010. – Vol.7. – P.283-289.
27. Avery C., Pereira J., Moody A., Whitworth I. Negative pressure wound dressings of the radial forearm donor site// Int. J. Oral Maxillofac Surg.. – 2000. – Vol.29. №3. – P.198-200.
28. Baltzis D., Eleftheriadou I., Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights// Adv Ther. – 2014. – Vol.31. – P.817–836.
29. Bamberger C, Scharer A, Antsiferova M, et al. Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes// Am J Pathol. – 2005. - Vol.167. –P.733–747.
30. Barker JN, Jones ML, Mitra R, Crockett-Torabe E, Fautone JC, Kunkel SL, Warren JS, Dixit VM, Nickoloff BJ. Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes// Am J Pathol. – 1991. – Vol.139. – P.869–876.
31. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. et al. Growth factors and cytokines in wound healing// Wound Repair and Regeneration. – 2008. – Vol.16. – P.585–601.
32. Basseto F., Lancerotto L., Salmaso R., Pandis L., Pajardi G., Schiavond M., Tiengo C., Vindigni V. Histological evolution of chronic wounds under negative pressure //Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. - 2012. – Vol.65. –P.91-99.

33. Blakytyn R, Jude EB, Gibson JM, Boulton AJM, Ferguson MWJ. Lack of insulin-like growth factor I (IGF I) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers// J Pathol. – 2000. – Vol.190. – P.589–594.
34. Blakytyn R. and Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes // Diabet. Med .- 2006. – Vol.23. – P.594–608.
35. Blume P., Walters J., Payne W., Ayala J., Lantis J. Comparison of Negative Pressure Wound Therapy Using Vacuum-Assisted Closure With Advanced Moist Wound Therapy in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. A multicenter randomized controlled trial//Diabetes care. – 2008. – Vol.31. - №4.- P. 631-636.
36. Boone D., Braitman E., Gentics C. Bacterial burden and wound outcomes as influenced by negative pressure wound therapy// Wounds. – 2010. - Vol.22. –P.32-37.
37. Boulton A., Cavanagh P., Raymann G. The foot in diabetes, 4th edition// John Willey& Sons, - 2006.Ltd. - P.214-221.
38. Brancato S., Albina J. Wound macrophages as key regulators of repair origin, phenotype, and function //American Journal of Pathology. -2011. – Vol.178. – P.19-27.
39. Brem, H., Stojadinovic O., Diegelmann R., Entero H., Lee B., Pastar I., Golinko I., Rosenberg H., Tomic-Canic M. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement// Mol. Med. –2007. - Vol. 13(1-2) – P.30–39.
40. Chen S., Li J., Li X., Xu L. Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study// Asian surgery. – 2005. - Vol. 28(3). –P.211-217.
41. Christman A., Selvin E., Margolis D., Lazarus G., Garza L. Hemoglobin A1c Predicts Healing Rate in Diabetic Wounds//Journal of Investigative Dermatology. - 2011. – Vol. 131. – P.2121–2127.
42. Cross S., Thompson M., Roberts M. Distribution of systemically administered ampicillin, benzylpenicillin, and flucloxacillin in excisional wounds in diabetic and

- normal rats and effects of local topical vasodilator treatment //Antimicrob Agents Chemother. – 1996. - Vol.40. – P.1703–1710.
43. Cullen B, Boyle C, Webb Y. Modulation of the chronic wound environment; an in vitro evaluation of advanced wound therapies. Presented at Symposium of Advanced Wound Care (SAWC) Tampa, FL, 2007.
 44. Cullen B, Kemp L, Essler L, Wallenfang-Sohle K, Stadler R. Rebalancing wound biochemistry improves healing: a clinical study examining effect of Promogran //Wound Repair and Regeneration. – 2004. - Vol. 12(2).
 45. Cullen B., Ivins N. Promogran & Promogran Prisma Made easy// Wounds international. – 2010. - Vol.1. - № 3.- p.1-6.
 46. Cullen B., Smith R., McCulloch E., et al. Mechanism of action of Promogran, a protease modulating matrix, for treatment of diabetic foot ulcers //Wound Repair and Regeneration. – 2002. - Vol. 10(1). – P.16-25.
 47. Cullen B., Watt P., Lundqvist C., et al. The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action //Int J Biochem Cell Biol. – 2002. - Vol. 34(12). –P.1544-1556.
 48. de Waal Malefyt R., Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes// J Exp Med. – 1991. – Vol. 174. –P.1209–1220.
 49. Denhardt D., Noda M., O' Regan A., Pavlin D., Berman J. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival// J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 107. –P.1055 – 1061.
 50. Di Lullo G., Sweeney S., Körkkö J., et al. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen //J Biol Chem. – 2002. - Vol. 277(6). –P.4223-4231.
 51. Dinh T., Tecilazich F., Kafanas A., Doupis J., Gnardellis C., Leal E., Tellechea A., Pradhan L., Lyons T., Giurini J., Veves A. Mechanisms Involved in the Development and Healing of Diabetic Foot Ulceration// Diabetes. – 2012. -Vol. 61. - P. 2937-2947.

52. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Broecker EB, Gillitzer R. Chemokines IL8, GROa, MCP1, IP10 and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing// *Am J Pathol.* – 1998. - Vol. 153. – P.1849–1860.
53. Erba P., Ogawa R., Ackermann M., Adini A., Miele L., Dastouri P., Helm D., Mentzer S., D'Amato R., Murphy G., Konerding M., Orgill D. Angiogenesis in wounds treated by microdeformational wound therapy// *Ann Surg.* – 2011. - Vol. 253(2). - P.402–409.
54. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot.// *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. - 1736–1743.
55. Ferguson M., Herrick S., Spencer M., Shaw J., Boulton A., Sloan P. The histology of diabetic foot ulcers.// *Diabet Med.* – 1996. - Vol. 13. – P.30– 33.
56. Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun C., Buerk D., Huang P., Jain R. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability// *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – Vol. 98. – P.2604–2609.
57. Gabriel A., Shores J., Berntein B., de Leon J., Kamepalli R., Wolvos T., Baharestani M., Gupta S. A clinical review of infected wound treatment with vacuum assisted closure (R) (VAC (R)) therapy: experience and case series// *Int Wound J.* – 2009. - Vol. 6. – P.1–25.
58. Galkowska H, Olszewski WL, Wojewodzka U, Mijal J, Filipiuk E. Expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers// *Surgery.* – 2003. – Vol. 134. –P.213–220.
59. Galkowska H., Wojewodzka U., Olszewski W.L. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in margin of chronic diabetic foot ulcers// *Wound repair and Regeneration.* – 2006. – Vol. 14. - 558-565.
60. Gibran N., et al. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus// *J. Surg. Res.* - 2002. – Vol. 108. – P.122–128.

61. Gordon S. Alternative activation of macrophages// *Nat Rev Immunol.* – 2003. – Vol. 3. – P.23–35.
62. Gordon S., Taylor P. Monocyte and macrophage heterogeneity// *Nat Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 5. – P.953–964.
63. Goyal A., Raina S., Kaushal SS., Mahajan V., Sharma N.L. Pattern of cutaneous manifestations in diabetes mellitus// *Indian J. Dermatol.* – 2010. - Vol. 55(1). –P.39-41.
64. Hao Meng, Zhenxiang Wang, Wenping Wang, Wei Li, Qinan Wu, Xiaotian Lei, Xinshou Ouyang, Ziwen Liang. Effect of osteopontin in regulating bone marrow mesenchymal stem cell treatment of skin wounds in diabetic mice// *Diabetes Metab Res Rev.* – 2014. – Vol. 30. – P.457–466.
65. Hunter C., Bond J., Kuo P. et al. The role of osteopontin and osteopontin aptamer (OPN-R3) in fibroblast activity// *J Surg Res.* – 2012. – Vol. 176. – P.348–358.
66. Hunter J., Teot L., Horch R., Banwell P. Evidence-based medicine: vacuum-assisted closure in wound care management// *International Wound Journal.* – 2007. - Vol 4. - № 3. – P.256-269.
67. International consensus on the diabetic foot. International Working Group on the Diabetic Foot, The Netherlands. – 1999. – P.20–96.
68. Isago T., Nazaki M., Kikuchi Y., et al. Effects of different negative pressures on reduction of wounds in negative pressure dressing// *J Dermal* 2003. - Vol.30(8). – P.596-601.
69. IWGDF Guidance on the diabetic foot 2015. International Working Group on the Diabetic Foot, Netherlands. - 2015.
70. Jacobs S., Simhaee D., Marsano A., Fomovsky G., Niedt G., Wu J. Efficacy and mechanisms of vacuum-assisted closure (VAC) therapy in promoting wound healing: a rodent model// *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009. – Vol. 62. – P.1331–1338.
71. Jongen-Lavrencic M., Peeters H., Rozemuller H., Rombouts W., Martens A., Vreugdenhil G., Pillay M., Cox P., Bijser M.m Brutel G., Breedveld F., Swaak A. IL-6-induced anaemia in rats: possible pathogenic implications for anaemia observed in chronic inflammations// *Clin Exp Immunol.* -1996. – Vol. 103. – P.328-334.

72. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJM, Ferguson MWJ. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers// *Diabetic Med.* – 2002. – Vol. 19. – P.440–447.
73. Jude EB, Boulton AJM, Ferguson WJ, Appleton I. The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1// *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42. – P.748–757.
74. Kakagia D., Kazakos K., Xarchas K., et al. Synergistic action of protease-modulating matrix and autologous growth factors in healing of diabetic foot ulcers. A prospective randomized trial// *J Diabetes Complications.* – 2007. - Vol. 21(6). – P.387-391.
75. Komine M., Rao L., Freedberg I., et al. Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes// *J Invest Dermatol.* – 2001. – Vol. 116. – P.330–338.
76. Kopp J., Hoff C., Rosenberg B., et al. Application of VAC therapy upregulates growth factor levels in neuropathic diabetic foot ulcers// *Wound Repair and regeneration.* – 2003. - Vol. 11(5). –P. 0-007.
77. Lavery L., Murdoch D., Kim P., Fontaine J., Thakral G., Davis K. Negative Pressure Wound Therapy With Low Pressure and Gauze Dressings to Treat Diabetic Foot Wounds. // *Journal of Diabetes Science and Technology.* – 2014. - Vol. 8. - №2. – P.346 –349.
78. Li Z., Guo S., Yao F., Zhang Y., Li T.. Increased ratio of serum matrix metalloproteinase-9 against TIMP-1 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers// *Journal of Diabetes and Its Complications.* – 2013. – Vol. 27. –P.380–382.
79. Lipsky B., Berendt A., Cornia P., Pile J., Peters E. , Armstrong D., Deery G., Embil J., Joseph W., Karchmer A., Pinzur M., Senneville E. Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections// *Clinical Infectious Diseases.* – 2012. - Vol. 54(12). – P.132–173.
80. Lipsky B., Gibbons G., Reiber G. The Burden of Diabetic Foot Ulcers// *The American journal of surgery.* – 1998. – Vol. 176 (Suppl 2A). – P. 5-10.

81. Liu, Y., Min, D., et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers// *Diabetes Care*. - 2009. - Vol. 32(1). – P.117–119.
82. Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, et al. Expression of metalloproteinases and growth factors in diabetic wounds treated with a protease absorbent dressing// *J Diabetes Complications*. - 2006. - Vol. 20(5). - P.329-35.
83. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds// *J Invest Dermatol*. – 1998. – Vol. 111. –P.850–857.
84. Maruyama K., et al. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing// *Am. J. Pathol*. - 2007. – Vol. 170. - P.1178–1191.
85. Materials of the 11th Annual Meeting of the European Tissue repair society, Cardiff, Wales, United Kingdom 1996.
86. Michel G, Kemeny L, Peter RU, Beetz A, Ried C, Arenberger P, Ruzicka T. Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells// *FEBS Lett*. – 1992. – Vol. 305. – P.241–243.
87. Miller C. The History of Negative Pressure Wound Therapy (NPWT): From “Lip Service” to the Modern Vacuum System // *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*. -2014. – Vol. 4. –P.61-62.
88. Mingyuan M., Yiwen N.; Ting X., Bo Y., Chun Q., Shuliang L. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: A possible pathophysiologic correlation// *Wound Rep Reg*. -2012. – Vol. 20. – P.203–213.
89. Miyazaki K., Okada Y., Yamanaka O., et al. Corneal wound healing in an osteopontin deficient mouse// *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2008. - 49: 1367–1375.
90. Mori .R., Shaw T., Martin P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring// *Journal of Experimental Medicine*. – 2008. – Vol. 205. – P.43-51.
91. Morykwas M., Faler B., Pearse D., Argenda L.. Effects of varying levels of subatmospheric pressure on the rate of granulation tissue formation in experimental wounds in swine// *Ann Plast Surg*. – 2001. – Vol. 47. – P.547-551.

92. Morykwas M., Howell H., Bleyer A., et al. The effect of experimentally applied subatmospheric pressure on serum myoglobin levels after a prolonged crush/ischemia injury// J Trauma. – 2002. - Vol.53(3). – P.537-540.
93. Morykwas MJ, Argenda LC. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience// Ann Plast Surg. – 1997. - Vol.38(6). – P.563-576.
94. Mosser D., Edwards J. Exploring the full spectrum of macrophage activation// Nature Reviews. Immunology. – 2008. – Vol. 8. – P.958-969.
95. Moulin V. Growth factors in skin wound healing// Eur J Cell Biol. – 1995. – Vol. 68. – P.1–7.
96. Muller M., Trocme C., et al. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: The ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing// Diabetic Medicine. - 2008. - Vol. 25(4). – P.419–426.
97. Murry C., Giachelli C., Schwartz S., Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis// Am. J. Pathol. – 1994. - Vol. 145. – P.1450-1462.
98. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis// Int J Biochem Cell Biol. – 1997. - Vol. 29. – P.5–17.
99. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S. Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes// Clin Exp Immunol. – 2000. – Vol. 121. – P.437–443.
100. Nwomeh B., Liang H-X, Cohen I., Yager D. MMP-8 is the predominate collagenase in healing wounds and non-healing ulcers// J Surg Res. – 1999. - Vol. 81(2). – P.189-195.
101. Pardo A., Gibson K., Cisneros J., et al. Upregulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis// PLoS Med. – 2005. – Vol. 2. – P.251.
102. Pecoraro R., Ahroli J., Boyko E., Stensel V. Chronology and Determinants of Tissue Repair in Diabetic Lower-Extremity Ulcers // Diabetes. – 1991. –Vol. 40. – P.1305-1313.

103. Petersen W, Varoga D, Zantop T, et al. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in tendon fibroblasts// J Orthop Res. – 2004. - Vol. 22(4). –P.847–853.
104. Pierce GF, Brown D, Mustoe TA. Quantitative analysis of inflammatory cells influx, procollagen type-I synthesis, and cross-linking in incisional wounds— influence of PDGF-BB and TGF-b1 therapy// J Lab Clin Med. – 1991. - Vol. 117. – P.373–82.
105. Price P.E., Fagervik-Morton H., Mudge E. et al. Dressing-related pain in patients with chronic wounds: an international patient perspective// Int Wound J. – 2008. – Vol. 5(2). – P. 159-171.
106. Rappolee D. et al. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping// Science. – 1988. - Vol. 241. – P.708-712.
107. Rayment E., Upton Z., Shooter G.. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer// Br J Dermatol. – 2008. - Vol. 158(5). – P. 951-61.
108. Robson M., Cooper D., Aslam R., Gould L.; Harding K.; Margolis D.; Ochs D., Serena T., Snyder R.; Steed D., Thomas D., Wiersma-Bryant L. Guidelines for the treatment of venous ulcers// Wound Rep Reg. – 2006. - Vol. 14. – P.649–662.
109. Romano G., Moretti G., Benedetto A., Giofre C., Di Cerare E., Russo G. Skin lesions in diabetes mellitus: Prevalence and clinical correlations// Diabetes Res. Clin Pract. – 1998. – Vol. 39. – P.101-106.
110. Saap L., Falanga V. Debridement performance index and its correlation with complete closure of diabetic foot ulcers// Wound repair and regeneration. – 2002. – Vol.10. - №6. – P.354-359.
111. Schebesch C., Kodelja V., Muller C., Hakij N., Bisson S., Orfanos C., Goerd S. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro// Immunology. – 1997. – Vol. 92. –P.478–486.

112. Schultz G., Sibbald R., Falanga V. et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management// *Wound Rep. Reg.* – 2003. – Vol. 11. – P.1–28.
113. Shure D, Senior RM, Griffin GL, Deuel TF. PDGF AA homodimers are potent chemoattractants for fibroblasts and neutrophils, and for monocytes activated by lymphocytes or cytokines// *Biochem Biophys Res Commun.* – 1992. - Vol. 186. – P.1519–1524.
114. Smeets R., Ulrich D., Unglaub F., et al. Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration// *Int Wound J.* – 2008. – Vol. 5. –P.195-203.
115. Solowiej K., Mason V., Upton D. Review of the relationship between stress and wound healing: part 1// *The journal of wound care.* – 2009. – Vol. 18. №9
116. Soon K., Acton C. Pain-induced stress: a barrier to wound healing// *Wounds UK.* – 2006. – Vol. 2(4). – P.92-101.
117. Stansby G., Wealleans V., Wilson L., Morrow D. Clinical experience of a new NWPT system in diabetic foot ulcers and post-amputation wounds// *Journal of wound care.* – 2010. -Vol.19. - №11. – P.499-503.
118. Stein M. et al. Interleukin4potentlyenhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation// *Journal of Experimental Medicine.* – 1992. - Vol. 176. –P. 287-292.
119. Tang Y., Zhang M., Hellmann J., Kosuri M., Bhatnagar A., Spite1 M. Proresolution Therapy for the Treatment of Delayed Healing of Diabetic Wounds// *Diabetes.* – 2013. – Vol.62. – P.617-627.
120. Timmers M., Le Cessie S., Banwell P., Jukema G. The effects of varying degrees of pressure delivered by negative-pressure wound therapy on skin perfusion// *Ann Plast Surg.* – 2005. – Vol. 55. – P.665–671.
121. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)// *Lancet.* – 1998. – Vol. 352. – P.837–853.

122. Vaughan E., Liew A., Mashayekhi K., Dockery P., McDermott J., Kealy B., Flynn A., Duffy A., Coleman C., O'Regan A., Barry F., O'Brien T. Pretreatment of Endothelial Progenitor Cells With Osteopontin Enhances Cell Therapy for Peripheral Vascular Disease// *Cell Transplantation*. – 2012. – Vol.21. - № 6. - P.1095-1107.
123. Veves A, Sheenan P, Pham HT. A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidised regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers// *Arch Surg*. – 2002. - Vol. 137(7) – P.822-827.
124. Veves A, Akbari CM, Primavera J, Donaghue VM, Zacharoulis D, Chrzan JS, DeGirolami U, LoGerfo F, Freeman R. Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease and foot ulceration// *Diabetes*. – 1998. – Vol. 47. – P.457–63.
125. Wackenfors A., Sjogren J., Gustafsson R. et al, Effects of vacuum-assisted closure therapy on inguinal wound edge microvascular blood flow// *Wound Repair*. – 2004. - Vol. 12(6). – P.600-606.
126. Webster J., Scuffham P., Sherriff K.L. negative pressure wound therapy for skin grafts and surgical wounds healing by primary intention// *Cochrane database Syst.Rev*. – 2012. - №4. – cd009261.
127. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines// *Physiol.Rev*. – 2003. – Vol. 83. –P.835-870.
128. Wetzler C, Kaempfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair// *J Invest Dermatol*. – 2000. – Vol. 115 –P.245–253.
129. Whitney J., Phillips L., Aslam R., Barbul A., Gottrup F.; Gould L., Robson M., Rodeheaver G., Thomas D., Stotts N. Guidelines for the treatment of pressure ulcers// *Wound Rep Reg*. – 2006. – Vol. 14. –P.663–679.
130. Willy C., von Thun-Hohenstein H., von Lübken F., Weymouth M., Kossmann T., Engelhardt M. Experimental principles of the VAC-therapy -pressure values in superficial soft tissue and the applied foam// *Zentralblatt fur Chirurgie [Europe PubMed central]*. - 2006. - Vol. 131(1). – P.20-61.

131. Wollina U., Schmidt W., Krönert C., et al. Some effects of a topical collagen-based matrix on the microcirculation and wound healing in patients with chronic venous leg ulcers: preliminary observations// Int J Low Extrem Wounds. – 2005. - Vol. 4(4). –P.214-224.
132. World Union of Wound Healing Societies' Initiative. Vacuum assisted closure: recommendations for use. A consensus document. – 2008. – P.10.
133. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT// Biochem Biophys Res Commun. – 2003. – Vol. 301. – P.841–847.
134. Zhou M., Yu A., Wu G., Xia C., Hu X., Qi B. Role of different negative pressure values in the process of infected wounds healing treated by vacuum-assisted closure: an experimental study//Int Wound J. - 2012. – P.1-10.