

Особенности хронических ран у больных сахарным диабетом и пути их коррекции

Токмакова А.Ю., Страхова Г.Ю., Арбузова М.И.

ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологии.

Хронические раневые дефекты (трофические язвы) стоп – часто встречающееся и специфичное для диабета поражение. Их определяют как эрозию кожи, распространяющуюся не только на эпидермис и дерму, но и проникающую в более глубоко расположенные ткани и характеризующуюся замедленной эпителизацией [13]. Распространенность хронических раневых дефектов нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом, по мнению различных авторов, составляет от 4 до 15% [16].

Локализация поражений на стопе зависит в основном от этиологических факторов. По данным эпидемиологических исследований у больных сахарным диабетом наиболее часто диагностируются раневые дефекты тыльной и подошвенной поверхностей пальцев, подошвенной поверхности в зоне проекции плюснефаланговых суставов и костей предплюсны. Последние характеризуются наиболее тяжелым течением и худшим клиническим прогнозом [14]. Большинство исследователей считает нейропатию, связанные с ней изменения периферической чувствительности и специфические изменения костных структур стопы наиболее значимым фактором в развитии хронических раневых дефектов мягких тканей нижних конечностей.

Для того чтобы правильно выбрать тактику лечения хронических раневых дефектов у больных сахарным диабетом, необходимо учитывать особенности течения раневого процесса у данной категории пациентов.

Пусковым механизмом раневого процесса является травма. Репарация включает четыре основные стадии [17]: коагуляция, воспаление, клеточная пролиферация и восстановление матрикса, эпителизация и ремоделирование рубцовой ткани. Эти стадии в отдельности и весь процесс в целом при остром повреждении могут длиться от 10 дней до месяца.

Хронические или незаживающие раны (трофические язвы) характеризуются дефектным ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса, нарушением реэпителизации и длительной воспалительной фазой. Эпидермис не может мигрировать в раневую зону, идет гиперпролиферация на краях дефекта, которая мешает нормальной клеточной миграции по раневому ложу. Возможная причина этого – ингибирование апоптоза среди популяций фибробластов и кератиноцитов. Дефекты у больных с синдромом диабетической стопы считаются «замершими» на фазе пролиферации [8]. Существует мнение, что в подобных случаях происходит чрезмерная экспрессия фибронектина и тромбоспондина, что приводит к клеточной дисфункции и дисрегуляции.

Известно, что в хронических ранах присутствует много фибриногена и фибрина. Была предложена гипотеза, что

эти белки нейтрализуют факторы роста. Это ведет к тому, что, несмотря на достаточное количество ростовых факторов внутри раны, они не способны активизировать процесс заживления [17]. Исследования продемонстрировали и такое различие между острой и хронической раной, как уровень воспалительных цитокинов [20].

Протеазы также могут дезактивировать факторы роста и цитокины, необходимые для заживления [20]. Матриксные протеиназы (ММП) относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, обеспечивающих деградацию белковых компонентов межклеточного матрикса и базальных мембран. На основании данных о первичной структуре, субстратной специфичности и клеточной локализации эти ферменты делят на четыре основных подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины и мембраносвязанные ММП.

К подсемейству желатиназ относят желатиназу А (ММП-2) и желатиназу В (ММП-9). Они способны расщеплять коллаген IV и V типов, эластин, входящий в состав базальных мембран, и денатурированный коллаген, что дает им способность участвовать в деградации фибриллярных коллагенов [10]. Желатиназы также способны гидролизовать коллагены других типов и ряд белков соединительнотканного матрикса [3].

Данных о свойствах ММП получены либо в условиях эксперимента, либо с использованием рекомбинантных ферментов и их ингибиторов [11, 18, 19]. Результатов клинических исследований роли ММП в процессе заживления хронических ран крайне мало, что определяется не в последнюю очередь трудностями в получении материала для изучения. В то же время подобные сведения были бы необычайно важны, т.к. они могут помочь в оценке репаративных процессов и прогнозировать эпителизацию дефектов.

Имеются данные о влиянии некоторых фармакологических препаратов на уровень ММП. Trengove N.J. et al. [21] продемонстрировали снижение уровня ММП на 90% при использовании тканевого ингибитора, а также значительное снижение исходно повышенного уровня ММП при заживлении хронической раны. Теми же исследователями доказано, что применение факторов роста в лечении пациентов с варикозной болезнью ведет к увеличению содержания тканевых ингибиторов ММП (TIMP).

Проблема местного лечения хронических раневых дефектов широко обсуждается различными специалистами, работающими в этой области. Ежегодно появляются новые средства закрытия ран, разработчики которых предлагают препараты, воздействующие на различные патогенетические механизмы раневого процесса. Одним из современных

препаратов для местного лечения трофических язв является Промогран (Johnson&Johnson, США). В состав повязки входит специально обработанный бычий коллаген и окисленная восстановленная целлюлоза. Механизм действия повязки основан на способности входящего в ее состав бычьего коллагена конкурировать с собственным коллагеном раны во взаимодействии с протеолитическими ферментами. В частности, на экспериментальных моделях была показана способность компонентов Промограна связывать ММП в растворе [7]. Инкубация Промограна с экссудатом трофическим язв больных диабетом дала аналогичный результат. Механизм этой реакции пока до конца не изучен, предполагается, что имеет место нековалентное взаимодействие. Исследование других эффектов Промограна выявило его ингибирующее влияние на плазминоген и эластазу. В основном эффекты Промограна изучались на экссудатах раневых дефектов различного генеза [7]. В изученной литературе не встретились публикации, авторы которых исследовали бы действие данного препарата на основе анализа биоптатов тканей раны. В рамках данной работы была проанализирована эффективность использования Промограна в лечении больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы, влияние препарата на активность ММП непосредственно в тканях раневого дефекта и сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 20 пациентов. Основную группу составили 10 пациентов с сахарным диабетом (СД) 1 типа, нейропатической формой синдрома диабетической стопы (СДС) и длительно незаживающими язвенными дефектами плантарной поверхности, в комплексную терапию которых был включен Промогран. В контрольную группу вошли 10 больных СД 1 типа с аналогичными осложнениями, лечение которых проводили по стандартной методике (контроль СД, разгрузка конечности, антибактериальная терапия, местное лечение раневого дефекта с использованием атрауматичных повязок). В качестве контрольных показателей использовали скорость заживления раны, уровень ММП-2, ММП-9 и коллагенолитической активности биоптатов тканей раневых дефектов и сыворотки крови. Материал брали при первом визите пациента и через 3 недели лечения. Кусочки ткани (5–10 мм) из латерального края раны отмывали в физиологическом растворе и замораживали при $t = -40^{\circ}\text{C}$. В день определения активности ткань размораживали и гомогенизировали на холоде в PBS pH 7,4, содержащем 1%-ный раствор тритона X-100, в соотношении 20 мг ткани на 1 мл буфера и оставляли в холодильнике на 2 часа. Затем гомогенаты тканей центрифугировали при 40°C и 60 000 об./мин. В надосадочной жидкости определяли концентрацию белка, ММП-2, ММП-9 и коллагенолитическую активность.

Коллагенолитическую активность (КА) в гомогенатах ткани и сыворотке крови определяли фотометрическим методом с использованием в качестве субстрата азоколлагена (AZO DUE-IMPREGNATED COLLAGEN, Sigma, США). Для построения калибровочного графика использовали коммерческий препарат коллагеназы (Sigma, США).

Количество общей ММП-2 и ММП-9 определяли иммуноферментным методом наборами фирмы «R&D Systems» (США) согласно инструкциям производителя.

Клиническая характеристика групп пациентов представлена в таблице № 1.

Таблица № 1
Клиническая характеристика групп обследованных пациентов

Параметры	Промогран (n ₁ = 10)	Контроль (n ₂ = 10)
Возраст (M±m), лет	37,4±1,3	40,3±0,7
М/Ж	4/6	5/5
Длительность СД (M±m), лет	14,7±1,1	15,6±1,2
Длительность существования трофической язвы (M±m), мес.	12,4±0,6	9,7±0,7
НвА1с (M±m), %	8,6±1,6	9,0±0,8
Диабетическая ретинопатия:		
- непролиферативная, %	20	30
- препролиферативная, %	70	60
- пролиферативная, %	10	10
Диабетическая нефропатия:		
- стадия микроальбуминурии, %	10	0
- стадия протеинурии, %	80	80
- ХПН, %	10	20

Как видно из приведенных данных, группы были сопоставимы по полу, возрасту, стажу заболевания СД 1 типа, длительности течения раневого процесса. Все включенные в исследование пациенты имели выраженные микрососудистые осложнения. Уровень компенсации углеводного обмена был неудовлетворительным у всех обследованных.

Клиническая форма синдрома диабетической стопы была верифицирована на основании результатов исследования периферической иннервации (определение тактильной, температурной, вибрационной чувствительности) и оценки состояния магистрального кровотока по артериям голени и стопы методом ультразвуковой доплерографии и доплерометрии. У всех обследованных обнаружено снижение тактильной, температурной и вибрационной чувствительности. Лодыжечно-плечевой индекс был >1 .

При проведении рентгенографии костных структур стоп и голеностопных суставов у 5 больных основной группы и 3 контрольной группы была выявлена диабетическая остеоартропатия. Клинических и рентгенологических признаков остеомиелита обнаружено не было.

При оценке глубины и площади раневых дефектов были получены результаты, приведенные в таблице № 2.

Таблица № 2
Клиническая характеристика групп обследованных пациентов

Параметры	Промогран (n ₁ = 10)	Контроль (n ₂ = 10)
Площадь раневого дефекта (M±m), см ²	37,4±1,3	40,3±0,7
Глубина раневого дефекта (по Wagner)		
- I ст.	0	0
- II ст.	6	7
- III ст.	4	3

Раневые дефекты всех обследованных имели типичную для нейропатической формы СДС локализацию, глубина их не превышала III ст. по классификации Wagner. В исследова-

ние не включались пациенты с поверхностными эрозиями кожных покровов.

Пациентам основной группы Промогран накладывали на раневые дефекты с первого дня терапии. Смену повязки проводили 1 раз в два дня. Перед наложением новой повязки дефект очищали от некротических масс и экссудата с помощью хирургического инструмента и промывали физиологическим раствором температурой 37°C. Вторичной повязкой служила стерильная марлевая салфетка. Разгрузка пораженной зоны у пациентов как основной, так и контрольной группы достигалась использованием лечебной (разгрузочной) обуви или индивидуальной разгрузочной повязки (Total Contact Cast). Измерение параметров раневого дефекта проводили 1 раз в неделю.

Пациентам контрольной группы обработку раневых дефектов проводили по аналогичной методике. На рану накладывали нейтральную атравматическую повязку, а поверх нее – стерильную марлеву салфетку.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ результатов исследования КА, ММП-2 и ММП-9 в сыворотке крови и клеточном гомогенате, полученных у пациентов основной и контрольной групп до начала лечения, обнаружил их сопоставимость, что представлено в таблице № 3.

том, что лечение Промограном позволяет достичь более быстрого по сравнению со стандартной терапией сокращения хронических раневых дефектов мягких тканей стоп у больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы.

Исследование контролируемых параметров через 3 недели лечения показало достоверное снижение коллагенолитической активности и ММП-2 в сыворотке крови больных основной группы ($p < 0,05$), при этом достоверных изменений уровня ММП-9 не произошло ($p > 0,05$). Эти показатели после лечения достоверно различались в двух группах обследованных. В группе контроля не произошло достоверного изменения коллагенолитической активности (таблица № 5).

Динамика показателей коллагенолитической активности, ММП-2 и ММП-9 в клеточном гомогенате и сыворотки крови пациентов, получавших терапию Промограном, представлена в таблицах № 4–6.

Изменение показателей протеолитической активности в клеточных гомогенатах было более выраженным в группе больных, получавших лечение Промограном, но в обеих группах оно не было достоверным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение матриксных металлопротеиназ началось около десятилетия назад и на первых этапах проводилось

Таблица № 3
КА, ММП-2 и ММП-9 сыворотки крови и клеточного гомогената больных основной и контрольной групп ($M \pm \sigma$) ($p > 0,05$)

Группы	КА		ММП-2		ММП-9	
	Клеточный гомогенат (нг/мл)	Сыворотка крови (нг/мл)	Клеточный гомогенат (нг/мл)	Сыворотка крови (нг/мл)	Клеточный гомогенат (нг/мл)	Сыворотка крови (нг/мл)
Промогран	48,5±17,3	272,1±12,3	770±317,5	761,3±102,4	23,5±20,9	106,4±54,1
Контроль	50,1±12,5	288,5±19,5	754±290,1	750,1±283,7	22,9±19,6	105,5±63,5

Высокое значение показателей протеолитической активности подтверждало хронический характер течения раневого процесса у пациентов обеих групп.

Контрольное исследование состояния ран и биохимических параметров течения хронического раневого процесса было проведено спустя 3 недели от начала лечения. Динамика площади и глубины дефектов представлена в таблице № 4.

Таблица № 4
Результаты оценки раневых дефектов у обследованных пациентов после проведенной терапии ($*p < 0,001$)

Параметры	Промогран ($n^1 = 10$)	Контроль ($n^2 = 10$)
Площадь раневого дефекта до лечения ($M \pm m$), см ²	6,7±1,3	5,8±1,4
Площадь раневого дефекта после лечения ($M \pm m$), см ²	3,6±0,7*	4,9±1,3

Отмечено, что на фоне лечения Промограном произошло достоверное уменьшение площади раневых дефектов у пациентов основной группы ($p < 0,001$), что представлено на рисунках 1–3. У лиц контрольной группы на фоне стандартной терапии площадь дефектов также сократилась, но это изменение не было достоверным. Полученный результат говорит о

на экспериментальных моделях и клеточных культурах [17, 2]. Было доказано, что ММП проявляют свою активность на всех стадиях раневого процесса, начиная от экссудации и заканчивая формированием рубцовой ткани [6]. Протеазы участвуют во всех процессах, поддерживая баланс между синтезом и деградацией белковых структур, нарушение которого ведет к хронизации раневого процесса [18, 4]. Увеличение протеиназной активности – следствие их повышенной секреции, избыточной внеклеточной активации латентных форм ферментов, пониженного уровня их тканевых ингибиторов. Снижение внеклеточной регуляции протеолитической активности ведет к генерализации тканевой деструкции и хронизации раневого процесса. Эта гипотеза подтверждается результатами исследований [5], которые продемонстрировали, что повышение уровней протеиназ, особенно ММП, характерно для хронических ран (трофических язв) любого генеза, в том числе и при синдроме диабетической стопы. В то же время нет четких данных об особенностях динамики отдельных представителей семейства протеаз в ходе репаративного процесса.

Представляет интерес исследование коллагенолитической активности крови пациентов с хроническими раневыми дефектами на фоне сахарного диабета. Предполагается, что этот показатель у лиц с СД должен коррелировать с



Рис. 1

Рис. 2

Рис. 3

Рис. 1 – хронический раневой дефект больного с нейропатической формой синдрома диабетической стопы до начала лечения; **рис. 2** – раневой дефект в процессе лечения (на ране – Промогран); **рис. 3** – раневой дефект через 3 недели лечения

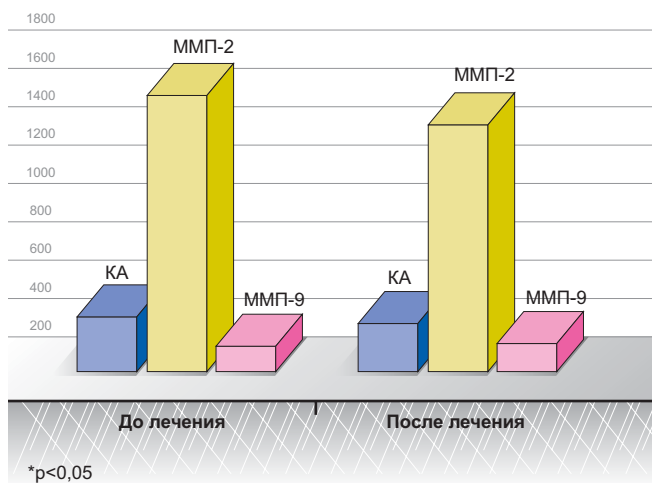


Рис. 4

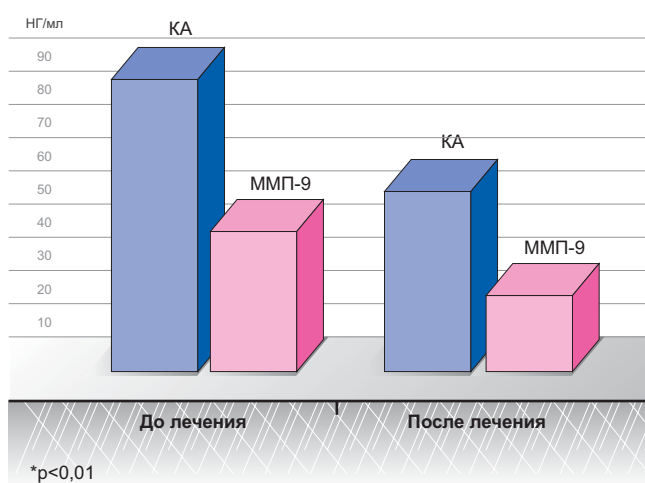


Рис. 5

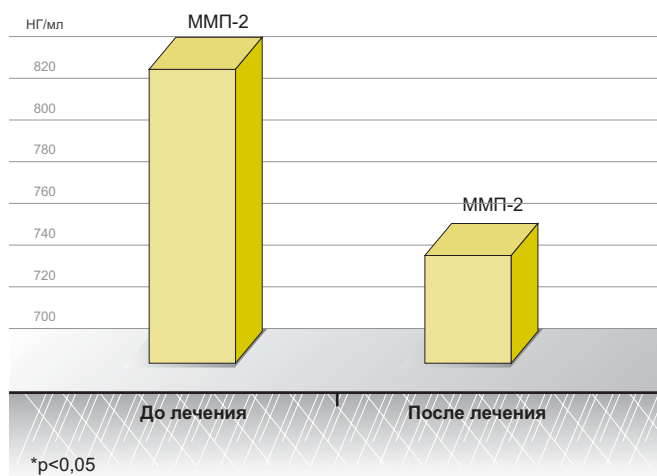


Рис. 6

Рис. 4 – коллагенолитическая активность, ММП-2 и ММП-9 клеточного гомогената больных на фоне лечения Промограном; **рис. 5** – динамика коллагенолитической активности и ММП-9 сыворотки крови на фоне лечения Промограном; **рис. 6** – динамика ММП-2 сыворотки крови на фоне лечения Промограном

Таблица № 5

Показатели КА, ММП-2 и ММП-9 у больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы через 3 недели лечения (M±σ) (*p>0,05)

Группы	КА		ММП-2		ММП-9	
	Клеточный гомогенат (нг\мл)	Сыворотка крови (нг\мл)	Клеточный гомогенат (нг\мл)	Сыворотка крови (нг\мл)	Клеточный гомогенат (нг\мл)	Сыворотка крови (нг\мл)
Промогран	46,5±16,8	172,1±12,3*	665±317,7*	561,3±102,4*	22,5±21,4	106,4±54,1
Контроль	51,1±11,8	291,5±17,5	752±276,0	832,1±132,7	32,7±13,4	110,3±53,5

уровнем коллагенолитической активности в самой ране, т.к. усиленный на фоне автономной нейропатии кровотоков может приводить к быстрому поступлению всех продуктов клеточной активности в кровь. В том случае, если это предположение верно, данный метод исследования должен облегчить наблюдение за больными с хроническими раневыми дефектами стоп, возникшими на фоне диабетической нейропатии.

Результаты, полученные у пациентов обеих групп до начала лечения, продемонстрировали высокий уровень коллагеназной активности, ММП-2 и ММП-9 как в сыворотке крови, так и в клеточном гомогенате. Исследование, проведенное через 3 недели терапии, выявило достоверно более выраженное снижение коллагенолитической активности в материале пациентов основной группы по сравнению с контрольной. Особенно значительные изменения зарегистрированы в уровне ММП-9 как в сыворотке крови, так и в клеточном гомогенате. Это подтвердило имеющиеся в литературе данные об эффективности использования Промограна у больных с трофическими язвами нижних конечностей. Была выявлена прямая корреляционная зависимость изменений активности ферментов в крови и тканях раны ($r = 0,7$), что подтверждает гипотезу о возможности использования сыворотки крови для оценки течения раневого процесса.

Таким образом, проведенное исследование показало, что коллагенсодержащие повязки (Промогран, Jonson&Jonson) могут эффективно использоваться в комплексной терапии пациентов с нейропатической формой синдрома диабетической стопы. Эффект Промограна основан на его способности снижать активность раневых протеолитических ферментов, препятствуя тем самым лизису белковых структур, в первую очередь коллагена. Применение данного средства закрытия раны позволяет значительно сократить сроки заживления трофических язв стоп у больных этой группы, что ведет к значительному снижению затрат на госпитальном этапе лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agren M.S., Steenfors H.H., Dabelsteen S., Hansen J.B., Dabelsteen E. Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic leg ulcers is ulcer-dependent. // J Invest Dermatol. – 1999. – v. 112. – p. 463-469.
2. Arkell J., Jackson C.J. Constitutive secretion of MMP-9 by early-passage cultured human endothelial cells. // Cell Biochem Funct. – 2003. – v. 21, №4. – p. 381-386.
3. Baker E.A., Leaper D.J. Profiles of matrix metalloproteinase and their tissue inhibitors in intraperitoneal drainage fluid: relationship to healing. // Wound Rep Reg. – 2003. – v. 11, №4. – p. 268-274.
4. Barrick B., Campbell E.J., Owen C.A. Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. // Wound Rep Reg. – 1999. – v. 7. – p. 410-422.
5. Bullen E.C., Longaker M.T., Updike D.L., Benton R. Et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. // J Invest Dermatol. – 1995. – v. 104. – p. 236-240.
6. Clark R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. / In: Clark R.A.F., editor. The molecular biology of wound repair (2-nd ed.). New York: Plenum Press. – 1996. – p. 3-51.
7. Cullen B., Smith R., Macculloch E., Silcock D., Morrison L. Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. // Wound Rep Reg. – 2002. – v. 10, № 1. – p. 16-25.
8. Fedele D., Comi G., Coscelli C., Cuccinotta D. et al. Italian diabetic neuropathy Commetec. A multicentre study on the prevalence of diabetic neuropathy in Italy. // Diabetes Care. – 1997. – v. 20. – p. 836-843.
9. Essler A., Boyle C., Cullen B. Extracellular matrix regulation and the role of proteases. // Wound Rep Reg. – 2006. – v. 14, № 2. – A59.
10. Gillard J., Reed M.W.R., Buttle D., Cross S.S. et al. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. // Wound Rep Reg. – 2004. – v. 12, № 3. – p. 295-304.
11. Murphy G. Matrix metalloproteinase and their inhibitors. // Acta Orthop Scand Suppl. – 1995. – v. 266. – p. 55-60.
12. Parks W.C. Matrix metalloproteinases in repair. // Wound Rep Reg. – 1999. – v. 7. – p. 423-432.
13. Reiber G.E. Epidemiology of foot ulcers and amputations in the diabetic foot. / In: Levin and O'Neal's The Diabetic Foot (6-th ed.). Mosby. – 2001. – p.13-32.
14. Reiber G., Lipsky B., Gibbons G. The burden of diabetic foot ulcers. // Am J Surg. – 1998. – v. 176. – 5s-10s.
15. Revanti L., Kahari V-M., Matrix metalloproteinases in wound repair (review). // Int J Mol Med. – 2000. – v. 6. – p. 391-407.
16. Ross R.T. How to examine the nervous system, 3-th ed. Stamford: CT, Appleton&Lange. – 1999. – 64 p.,
17. Schultz G.S., Sibbald R.G., Falanga V., Ayello E.A. et al. Wound bed preparation: a systemic approach to wound management. // Wound Rep Reg. – 2003. – v. 11, suppl 2. – 1s-28s.
18. Singer A.J., Clark R.A. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. // N Eng J Med. – 1999. – v. 341. – p. 738-746.
19. Soo C., Shaw W., Zhang X., Longaker M.T. et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. // Plast Reconstr Surg. – 2000. – v. 105. – p. 638-647.
20. Szyte Van Dam P., Sweder Van Asbeck B., Willem Erkelens D. et al. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. // Diabetes\Metabolism Reviews. – 1995. – v. 11, №3. – p. 181-192.
21. Trengove N.J., Stacey M.C., MacAuley S., Bennett N et al. Analysis of acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. // Wound Rep Reg. – 1999. – v. 7. – p. 442-457.