

Влияние терапии отрицательным давлением на репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы

Зайцева Е.Л.¹, Доронина Л.П.¹, Молчков Р.В.¹, Воронкова И.А.¹, Митиш В.А.², Токмакова А.Ю.^{1,3}

¹ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор – академик РАН И.И. Дедов)

²ФГБУ Институт хирургии им. А.В. Вишневского
(директор – академик РАН В.А. Кубышкин)

ЗГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва
(ректор – член-корр. РАН П.В. Глыбочко)

Цель. Оценить интенсивность репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с синдромом диабетической стопы на фоне местного применения отрицательного давления по сравнению со стандартной консервативной терапией.

Материалы и методы. Проанализированы клинические (размеры, оксигенация тканей), гистологические (световая микроскопия) и иммуногистохимические (CD68, MMP-9, TIMP-1) особенности репаративных процессов мягких тканей нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом на фоне терапии отрицательным давлением по сравнению со стандартным лечением. Обследован 31 пациент с синдромом диабетической стопы после хирургической обработки и до пластического закрытия раневого дефекта. В периоперационном периоде 13 пациентов получили терапию отрицательным давлением (-90–120 мм рт.ст.), 18 – стандартное лечение.

Результаты. На фоне терапии отрицательным давлением у пациентов удалось достигнуть сокращения площади и глубины раневых дефектов на 26,6±17,2% и 40,5±25,6% соответственно (по сравнению с исходными данными), в отличие от группы контроля, где данные показатели составляли 23,5±19,4 и 21,8±21,6% соответственно. По результатам транскутанной оксиметрии в группе 1 зафиксировано более выраженное усиление локальной микрогемодинамики по сравнению с группой контроля ($p<0,04$). Важным критерием подготовки раны к пластическому закрытию является ее заполнение грануляционной тканью более чем на 75%. У 95% пациентов группы 1 сочные грануляции заполняли 89,1±17% раневого дефекта. По данным гистологического исследования тканей раневых дефектов после лечения, в группе 1 отмечалось существенное уменьшение отека на 80% ($p<0,05$), организация экстрацеллюлярного матрикса ($p<0,05$), исчезновение воспалительного инфильтрата на 90% ($p<0,05$) и формирование здоровой грануляционной ткани ($p<0,05$). В ходе иммуногистохимического исследования отмечалось более выраженное снижение количества макрофагов в дерме (окрашивание CD68) ($p<0,05$). В обеих группах было зафиксировано снижение уровня MMP-9. Однако соотношение MMP-9/TIMP-1 было ниже в группе 1 ($p<0,05$).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о более высокой эффективности терапии отрицательным давлением (-90–120 мм рт.ст.) по сравнению со стандартным лечением, что выражается в более быстром сокращении как площади, так и глубины ран, повышении локальной микроциркуляции, уменьшении воспаления. Это подтверждается результатами гистологического и иммуногистохимического исследований. Высокая эффективность указанного метода местного лечения позволяет существенно сократить сроки подготовки раневого дефекта к следующему этапу хирургического лечения.

Ключевые слова: сахарный диабет; хронические раны; местное лечение; терапия отрицательным давлением; репарация; иммуногистохимические маркеры; гистология

Effect of negative pressure therapy on repair of soft tissues of the lower extremities in patients with neuropathic and neuroischaemic forms of diabetic foot syndrome

Zaytseva E.L.¹, Doronina L.P.¹, Molchikov R.V.¹, Voronkova I.A.¹, Mitish V.A.², Tokmakova A.Yu.^{1,3}

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

²The A.V. Vishnevsky Institute of surgery, Moscow, Russian Federation

³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Aim. To evaluate the efficiency of topical negative pressure wound therapy (NPWT) compared with standard therapy for the regeneration of the soft tissues of the lower extremities in patients with diabetic foot syndrome.

Materials and methods. The effects of negative pressure therapy on the clinical (size, tissue oxygenation), histological (light microscopy) and immunohistochemical (CD68, MMP-9, TIMP-1) aspects of repair of the soft tissue of the lower extremities in patients with diabetes mellitus were compared with those of standard treatment. Thirty-one patients with diabetic foot ulcers were included in the study from the moment of debridement until the plastic closure of the wound. During the perioperative period, 13 patients received NPWT (-90 to -120 mmHg) and 18 patients received standard therapy.

Results. A reduction of the wound area ($26.6\% \pm 17.2\%$) and the depth of the defects ($40.5\% \pm 25.6\%$) were achieved with negative pressure therapy compared with baseline data. In the control group, the corresponding values were $25.3\% \pm 19.4\%$ and $21.8\% \pm 21.6\%$, respectively. The results of transcutaneous oximetry showed a greater increase in the level of local hemodynamics in the study group ($p < 0.04$). An important criterion for wound preparation for a plastic closure is filling it with granulation tissue by more than 75%. In the study group, 95% of patients had wounds filled with $89.9\% \pm 17\%$ of abundant granulation tissue. The histological data of the study group show a significant reduction of oedema by 80% ($p < 0.05$), improved extracellular matrix organization ($p < 0.05$), 90% ($p < 0.05$) dissolution of inflammatory infiltrate and the formation of healthy granulation tissue ($p < 0.05$). Immunohistochemical analysis demonstrated a significant decrease in the number of macrophages in the dermis (CD68 expression) ($p < 0.05$). In both groups, the level of MMP-9 was decreased. However, the ratio of MMP-9:TIMP-1 was lower in the study group ($p < 0.05$).

Conclusion. The findings suggest that negative pressure therapy (-90 to -120 mmHg) is more efficient compared with standard treatment and achieves more rapid reduction of the area and depth of the wound, increased local microcirculation and decreased inflammation. These findings were confirmed histologically and immunohistochemically. The high efficiency of this method significantly reduced the time required for preparing the wound for the next surgical treatment.

Keywords: diabetes mellitus; chronic wounds; local treatment; negative pressure therapy; tissue repair; immunohistochemical markers; histology

DOI: 10.14341/DM20143113-121

Хронические раневые дефекты нижних конечностей могут развиваться у четверти всех больных сахарным диабетом (СД), что является причиной 20% случаев госпитализаций в этой группе и зачастую приводит к ампутации на уровне голени [1]. В течение 5 лет 50% из ранее оперированных нуждаются в ампутации контрлатеральной конечности. Обычно течение хронических ран при диабете отличается большой длительностью, сложностью и высокой стоимостью лечения, неоднозначным терапевтическим прогнозом. Стандартные методы не всегда позволяют достичь заживления.

Известно, что при длительном и плохо контролируемом СД процесс заживления раневых дефектов замедлен как за счет снижения уровня местных факторов роста, так и в связи с наличием поздних микро- и макрососудистых осложнений. Снижение периферической чувствительности, нарушение локальной микрогемодинамики, хроническая гипергликемия повышают риск формирования трофических язв и их последующего инфицирования [2].

Ключевую роль в замедлении процессов заживления играют гипергликемия и гликирование белков. Имеются данные о нарушении синтеза факторов роста [3], изменении процессов ангиогенеза и аккумуляции коллагена, снижении барьерной функции эпидермиса и качества грануляционной ткани [4] у лиц с СД. Также отмечена дезорганизация процессов миграции и пролиферации кератиноцитов и фибробластов, снижение количества нервных волокон эпидермиса [5], дисбаланс между аккумуляцией компонентов экстрацеллюлярного матрикса и их remodelированием с помощью матриксных металлопротеаз [6].

Раневые дефекты при СД обычно отличаются более продолжительной фазой воспаления, снижением активности воспалительных клеток и замедлением перестройки экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). Именно эти нарушения способствуют переходу раны из острой в хроническую [7].

Известно, что в фазе воспаления основными клетками, участвующими в процессе заживления, являются макрофаги, они продуцируют такие факторы роста, как фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста (TGF), колониестимулирующий фактор роста (GM-CSF) [8]. Все они способствуют переходу раны в фазу заживления за счет организации экстрацеллюлярного матрикса и коллагеновой сети. При переходе раны в фазу пролиферации происходит снижение уровня макрофагов и миграция кератиноцитов в раневое ложе, взаимодействие между матриксными металлопротеазами (MMP), интегринами, цитокинами, в результате которого происходит продукция ЭЦМ [3].

Уровень MMP существенно влияет на заживление раневых дефектов за счет замедления перестройки экстрацеллюлярного матрикса и формирования коллагеновой сети. Доказано, что высокий уровень MMP-9 в раневом экссудате является маркером воспаления и нарушенного заживления ран при СД [9].

Установлено, что соотношение MMP-9 и тканевого ингибитора металлопротеазы – 1 (TIMP-1) в экссудате снижалось в ходе эффективного лечения раневых дефектов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2), в отличие от группы лиц с плохо заживающими язвенными дефектами, где этот показатель оставался повышенным [10, 11].

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика групп пациентов

Показатель	Группа 1 (n=13)	Группа 2 (n=18)	p-value
Возраст, лет	55,3±12	59,2±9	>0,05
Тип СД (1/2)	3/10	1/17	>0,05
Длительность течения СД, лет	18,31±8,36	12,17±6,03	<0,05
HbA _{1c} , %	9,2±1,8	9,0±1,5%	>0,05
ХС общ., ммоль/л	3,39±0,71	4,05±0,96	>0,05
ЛПВП, ммоль/л	0,70±0,13	0,73±0,16	>0,05
ХС ЛПНП, ммоль/л	1,84±0,61	2,44±0,81	>0,05
ТГ, ммоль/л	1,64±0,61	1,62±0,45	>0,05
Гемоглобин, г/л	105,13±9,3	102,8±8,1	>0,05
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	10,81±2,42	11,35±1,46	>0,05
Белок общ. сыворотки, г/л	64,3±4,2	65,2±3,7	>0,05
СКФ (MDRD), мл/мин/1,73м ²	78,3±32,0	86,0±33,0	>0,05
Площадь ран, см ²	35,8±26	37,0±25	>0,05
Глубина ран, см	4,05±2,79	3,57±1,8	>0,05
Стадии раневого процесса по Wagner, количество пациентов:			
II, абс. (%)	7 (54)	7 (39)	>0,05
III, абс. (%)	6 (46)	11 (61)	
Оксигенация мягких тканей стопы, мм рт.ст.	33,7±17	32,1±17,8	>0,05

Терапия отрицательным давлением (вакуум-терапия, VAC, NPWT) – достаточно успешно применяемый метод лечения ран различного генеза. Считается, что отрицательное давление ускоряет процессы заживления.

Выдвинуты различные теории, объясняющие его эффективность: сокращение раны, стабилизация раневой среды (посредством удаления медиаторов воспаления и цитокинов), снижение бактериальной обсемененности, уменьшение отека за счет удаления экссудата и стимуляция заживления посредством микродеформации клеток [12].

Однако полученные данные чаще всего базируются на единичных клинических случаях или лабораторных исследованиях.

Несмотря на уже известные положительные клинические эффекты вакуум-терапии, молекулярные механизмы влияния отрицательного давления на процессы репарации (в том числе и у лиц с СД) до конца не ясны.

В литературе встречаются сведения о повышении плотности сосудов и экспрессии маркера эндотелия сосудов CD31, снижении маркера макрофагов (CD68) и лимфоцитов (CD45), что говорит о переходе раневого процесса в стадию эпителизации (по результатам иммуногистохимического (ИГХ) исследования), а также клинически – заживление раневых дефектов у большинства пациентов к окончанию терапии отрицательным давлением [13].

Цель

Оценить интенсивность репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС) на фоне местного применения отрицательного давления по сравнению со стандартной консервативной терапией.

Материалы и методы

В исследование был включен 31 пациент (10 женщин и 21 мужчина) с нейропатической и нейроишемической формами (после реваскуляризации) СДС, которым была проведена хирургическая обработка раневого дефекта.

В качестве предоперационной подготовки к пластическому закрытию в течение 8±4 дней 13 больным (группа 1) применялась терапия отрицательным давлением (-90–120 мм рт.ст.) (VivanoTec, Hartmann, Германия). Смена повязки проводилась 1 раз в 3–4 дня с оценкой динамики размеров и состояния раны.

Пациенты группы контроля (18 человек) находились на стандартной терапии (ежедневная смена атрауматических повязок с жидкими антисептиками: промывание послеоперационной раны водным раствором йода (Бетадин, Повидон-йод), повязка Inadin, Systagenix; Silcofix, Povi).

Критерием готовности раны к закрытию являлось заполнение ее полости грануляциями на 75% и более.

До и после местного лечения пациентам проводился забор биопсийного материала тканей раневого ложа с последующим гистологическим и ИГХ исследованиями.

Пациенты обеих групп были достоверно сопоставимы по возрасту, уровню контроля углеводного обмена, выраженности микрососудистых осложнений, форме СДС, площади и глубине раневых дефектов, состоянию кровотока нижних конечностей (p>0,05). Группы незначительно отличались по длительности СД. (табл. 1).

При анализе результатов гистологического и ИГХ исследований биоптатов раневых дефектов, полученных после хирургической обработки и до начала предполагаемого лечения, установлено, что обе группы

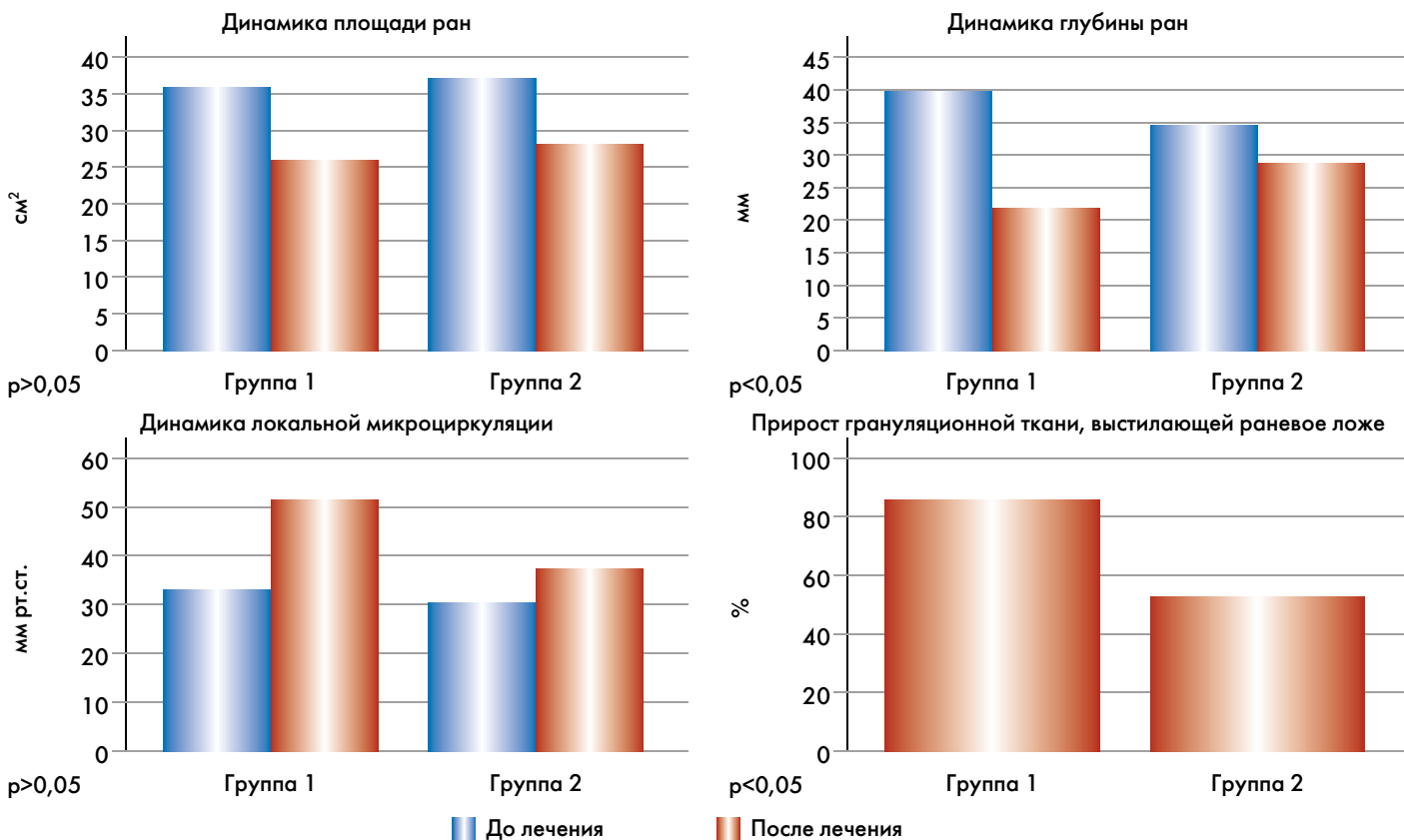


Рис. 1. Динамика состояния раневых дефектов на фоне лечения.

были также сопоставимы по состоянию репаративных процессов в мягких тканях. В обеих группах отмечался выраженный отек, плохо организованный экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ), низкое содержание фибробластоподобных клеток и выраженный воспалительный инфильтрат ($p < 0,05$). По результатам ИГХ исследования до начала терапии отмечалось интенсивное окрашивание маркера макрофагов (CD68) и матриксной металлопротеазы-9, слабое окрашивание TIMP-1. Данные результаты подтверждают замедление процессов репарации в мягких тканях у обеих групп больных. Все лабораторные исследования образцов крови проводились по стандартным методикам на базе биохимической лаборатории ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ России (зав. отделением – Ильин А.В.).

Площадь раны определялась методом очерчивания контуров раны через прозрачную масштабную пленку с последующим подсчетом площади внутри контура по специальным формулам (Opsite Flexgrid, Smith and Nephew).

Транскутанная оксиметрия выполнена на аппарате Radiometer (Дания). Датчики накладывались на расстоянии 0,5–1 см от краев раны.

Морфологические исследования проведены в отделении патоморфологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ России (и.о. зав. отделением – к.м.н. Абдулхабирова Ф.М.). Морфологический анализ биопсийного материала включал гистологический и ИГХ методы исследования до и после проводи-

мого лечения. Материал фиксировали в 10% растворе формалина, затем заливали в парафин по обычной методике. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали по стандартной схеме и окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистологические критерии воспаления, регенерации и состояния грануляционной ткани были оценены количественным методом согласно общепринятым принципам.

ИГХ исследование выполнили на иммуностейнере Leica BOND-MAX. Использовали характеристики антител фирмы Dako в стандартных разведениях с использованием положительного контроля. Применялись антитела к тканевому ингибитору металлопротеиназы-1 (TIMP-1), к матриксной металлопротеазе-9 (ММП-9), маркеру макрофагов CD68.

Оценка экспрессии цитоплазматических маркеров (TIMP-1, ММП-9, CD68) проводилась полуколичественным методом: 1 «+» – окрашивание единичных клеток (менее 30% клеток), 2 «+» – 30–60% клеток, 3 «+» – 60–90%, 4 «+» – более 90% клеток.

Исследование проведено в дизайне сравнительного.

Протокол исследования одобрен на заседании этического комитета ФГБУ ЭНЦ от 28 ноября 2012 г. (протокол №18). Всеми пациентами подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Статистический анализ проведен с помощью программы «Статистика 7.0» (StatSoft). Для сравнения количественных признаков использовали критерий Манна-Уитни, для качественных – точный критерий

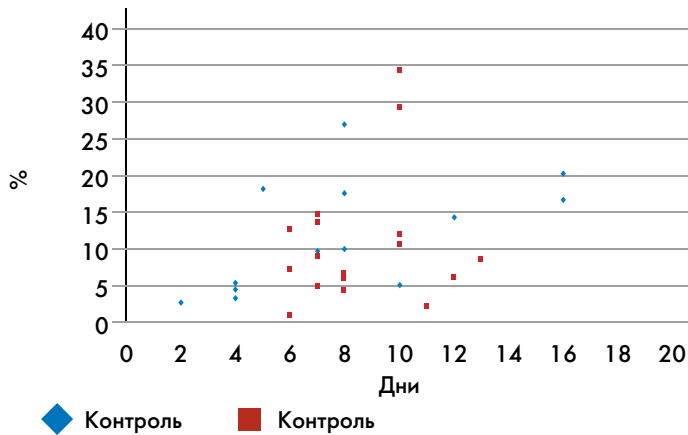


Рис. 2. Зависимость изменения площади язвы (%) от длительности терапии (дни).

Фишера. Для описания признаков использовали среднее значение со среднеквадратичным отклонением. Корреляцию проводили по Спирмену. Нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$.

Результаты

На рис. 1 представлена динамика клинического состояния раневых дефектов после 8 ± 4 дней терапии.

На фоне терапии отрицательным давлением у пациентов удалось достигнуть сокращения площади и глубины раневых дефектов на $26,6 \pm 17,2\%$ и $40,5 \pm 25,6\%$ соответственно (по сравнению с исходными данными) ($p < 0,05$). В отличие от группы контроля, где данные показатели составляли $23,5 \pm 19,4$ и $21,8 \pm 21,6\%$ соответственно ($p < 0,05$).

Однако динамика размеров ран на фоне лечения существенно не различалась между группами ($p = 0,064$), в отличие от динамики глубины. В группе, получавшей терапию отрицательным давлением, определялось более значимое сокращение глубины ран после лечения по сравнению с группой контроля ($p = 0,037$).

По результатам транскутанной оксиметрии в группе 1 зафиксировано более выраженное усиление локальной микрогемодинамики по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Важным критерием подготовки раны к пластическому закрытию является ее заполнение грануляционной тканью более чем на 75% . У 95% пациентов группы 1 сочные грануляции заполняли $89,1 \pm 17\%$ раневого дефекта.

У 89% пациентов из группы контроля грануляции покрывали $54,3 \pm 18\%$ раневого ложа ($p < 0,05$).

Установлена корреляционная связь между длительностью вакуум-терапии и динамикой размеров ран. Разница площади язвенных дефектов имеет более высокую корреляцию как со значениями отрицательного давления, так и с длительностью вакуум-терапии (коэффициенты $0,34$ и $0,55$ соответственно).

В контрольной группе длительность терапии коррелировала с изменением площади и глубины ран с коэффициентами $0,18$ и $0,46$ соответственно (рис. 2, 3).

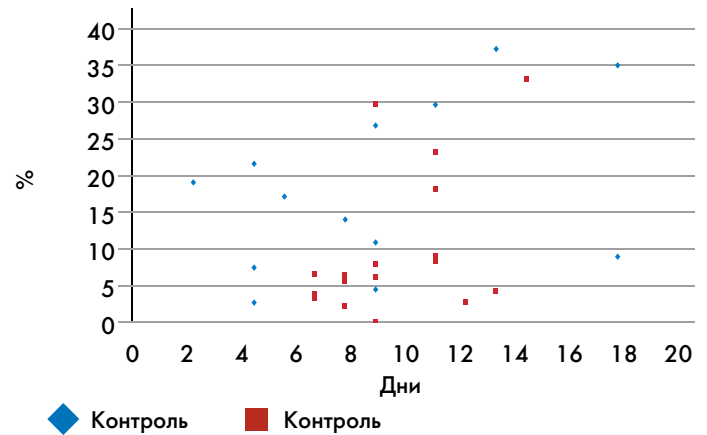


Рис. 3. Зависимость изменения глубины язвы (%) от длительности терапии (дни).

По данным гистологического исследования тканей раневых дефектов после лечения в группе 1 по сравнению с группой контроля отмечалось существенное уменьшение отека на 80% ($p < 0,05$), организация экстрацеллюлярного матрикса ($p < 0,05$), исчезновение воспалительного инфильтрата на 90% ($p < 0,05$) и формирование здоровой грануляционной ткани ($p < 0,05$).

В ходе ИГХ исследования с антителами к маркеру макрофагов CD68 на фоне проведенного лечения отмечалось снижение количества макрофагов в дерме. В обеих группах до лечения выраженность экспрессии CD68 в баллах составляла $2,5 \pm 0,5$ ($p > 0,05$), после лечения в группе 1 – $1,5 \pm 0,3$ балла ($p < 0,05$), в группе 2 – $2,0 \pm 0,6$ баллов ($p < 0,05$). До лечения уровень экспрессии MMP-9 в обеих группах в среднем составлял $3,5 \pm 1$ баллов ($p > 0,05$). В обеих группах на фоне лечения было зафиксировано снижение уровня MMP-9: в группе 1 – до $3 \pm 0,5$ баллов, в группе 2 – до $2,8 \pm 0,4$, однако данные различия не были статистически значимы ($p = 0,05$). Уровень экспрессии TIMP-1 на фоне терапии отрицательным давлением, наоборот, существенно повысился: с $2,5 \pm 0,5$ баллов до $3,3 \pm 0,3$ ($p < 0,05$), в отличие от группы контроля, где данный показатель, наоборот, снизился с $2,5 \pm 0,6$ баллов до $1,8 \pm 0,6$ ($p < 0,05$). Соотношение MMP-9/TIMP-1 было ниже в группе 1 ($p < 0,05$).

Обсуждение

Были изучены особенности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у 31 пациента с нейропатической и нейроишемической формами (после восстановления кровотока) СДС, получавших в периоперационном периоде терапию отрицательным давлением или стандартное лечение.

Больные были сопоставимы по возрасту, длительности СД, выраженности микрососудистых осложнений, размерам и состоянию раневых дефектов, оксигенации мягких тканей.

По результатам гистологического исследования тканей раневых дефектов до лечения зафиксировано замедление репаративных процессов, что проявлялось выраженным межклеточным отеком, дезорганизацией



Рис. 4. Внешний вид раны до начала терапии отрицательным давлением.



Рис. 5. Состояние раневого дефекта на 6-е сутки терапии отрицательным давлением (-100 мм рт.ст.).



Рис. 6. Внешний вид раны до начала стандартной терапии.



Рис. 7. Состояние раневого дефекта на 12-е сутки стандартной терапии.

экстрацеллюлярного матрикса и выраженными воспалительными проявлениями. Полученные данные совпадают с результатами опубликованных ранее исследований, свидетельствующих о замедлении процессов заживления у пациентов с СД [2, 3, 5].

Установлено, что раны при нарушениях углеводного обмена характеризуются более продолжительной фазой воспаления, снижением активности воспалительных клеток и замедлением перестройки ЭЦМ. Именно эти нарушения способствуют переходу раны из острой в хроническую [7].

Известно, что у лиц с СД снижено количество продуцируемого коллагена, что приводит к замедлению сокращения размеров раны. Известно, что в фазе воспаления основными клетками, участвующими в процессе заживления, являются макрофаги, синтезирующие такие факторы роста, как фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста (TGF), колониестимулирующий фактор роста (GM-CSF) [8]. Они играют одну из ключевых ролей в переходе раны в фазу заживления за счет организации экстрацеллюлярного матрикса и коллагеновой сети. Когда фаза воспаления сменяется фазой пролиферации, происходит снижение уровня макрофагов и миграция кератиноцитов в раневое ложе, взаимодействие между матриксными металлопротеиназами (MMP), интегринами и цитокинами, в результате чего происходит продукция ЭЦМ [3]. В ходе ИГХ исследования мягких тканей ран отмечено повышенное количество макрофагов (высокий уровень экспрессии CD68), повышение уровня MMP-9 и снижение уровня экспрессии TIMP.

Таким образом, полученные клинические и морфологические результаты свидетельствуют о хроническом течении раневого процесса. Можно предположить, что причиной замедления заживления является «застывание» ран в фазе воспаления, что подтверждается

результатами как гистологического, так и ИГХ методов исследования.

В литературе описаны положительные эффекты вакуум-терапии: клеточные (формирование грануляционной ткани), внеклеточные (усиление кровотока, уменьшение отека и снижение протеолитической активности раневой среды) и комплексные (очистка раны, контроль инфекции, возможность анализа полученного экссудата) [13].

На фоне терапии отрицательным давлением у пациентов удалось достигнуть сокращения площади и глубины раневых дефектов на $26,6 \pm 17,2\%$ и $40,5 \pm 25,6\%$ соответственно (по сравнению с исходными данными). В отличие от группы контроля, где данные показатели составляли $23,5 \pm 19,4$ и $21,8 \pm 21,6\%$ соответственно.

Следовательно, можно говорить о более высокой эффективности отрицательного давления в сокращении размеров ран.

В ходе лечения в группе 1 отмечался более интенсивный прирост грануляционной ткани, выстилающей раневое ложе. Данные клинические эффекты позволили выполнить следующий этап хирургического лечения у пациентов этой группы в более ранние сроки.

У пациентов группы 2, которым проводили ежедневные перевязки с антисептическими растворами, размеры раны сократились в меньшей степени, у 89% пациентов определялось низкое качество грануляций и обильная экссудация, что потребовало повторной хирургической обработки и увеличило сроки пребывания больных в стационаре (рис. 4–7).

По результатам транскутанной оксиметрии прирост парциального давления кислорода составил 23,2% (в группе контроля – 18%). Как известно, неоваскуляризация и усиление локальной гемодинамики являются важнейшими факторами, способствующими заживлению раневых дефектов. Так, исследование Dinh et al. продемонстрировало, что количество со-

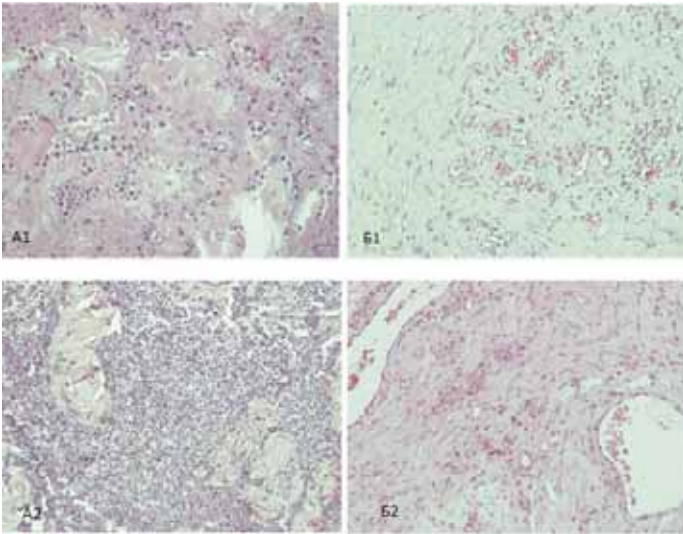


Рис. 8. Гистологическая картина препаратов мягких тканей раневых дефектов до и после терапии.

- A1. Гистологическая картина препарата мягких тканей раневого дефекта до лечения (г-э. $\times 200$). Поверхностный лейкоцитарно-некротический слой, состоящий преимущественно из лейкоцитов, детрита сливающихся клеток грануляции. Выраженный межклеточный отек.
- B1. Препарат мягких тканей раневого дефекта через 10 дней VAS-терапии (г-э. $\times 200$). Уменьшение количества клеток воспаления, уменьшение отека, увеличение количества капилляров, увеличение количества волокон с формированием полей волокнистой и соединительной ткани.
- A2. Препарат мягких тканей раневого дефекта до лечения (г-э. $\times 200$). Поверхностный слой представлен некротическим детритом, лимфоидными элементами разной степени зрелости, колониями микроорганизмов.
- B2. Препарат мягких тканей раневого дефекта после 11 дней стандартной терапии (г-э. $\times 400$). Уменьшение отека и клеток воспалительного инфильтрата. Сохраняется межклеточный отек, присутствуют клетки воспаления. Сосуды с периваскулярным отеком.

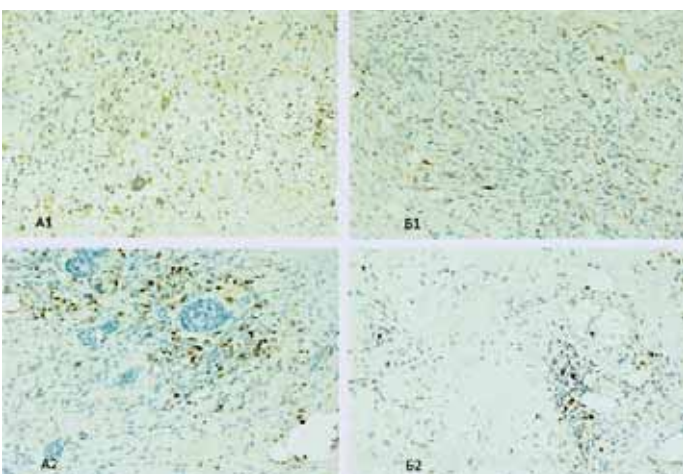


Рис. 9. Иммуногистохимическая картина экспрессии маркера макрофагов CD68.

- A1, A2. До лечения в обеих группах определяется интенсивная экспрессия CD68 – маркера макрофагов.
- B1. На фоне терапии отрицательным давлением количество макрофагов снизилось ($\times 200$) в большей степени, чем в группе контроля (B2). $\times 200$.

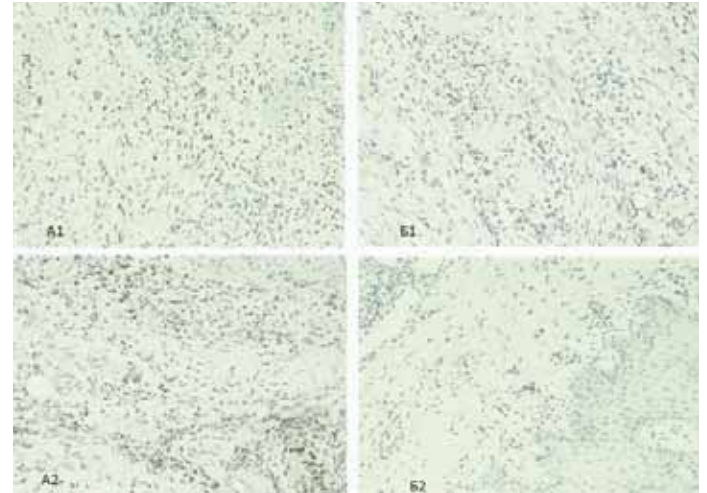


Рис. 10. Иммуногистохимическая картина экспрессии MMP-9.

- A1, A2. Интенсивная экспрессия MMP-9 в исследуемых образцах ткани из раневого дефекта до лечения ($\times 200$).
- B1. Состояние раневого дефекта после 8 дней терапии отрицательным давлением – значительное снижение экспрессии MMP-9 ($\times 200$).
- B2. Отсутствие экспрессии MMP-9 на фоне 10 дней стандартной терапии ($\times 200$).

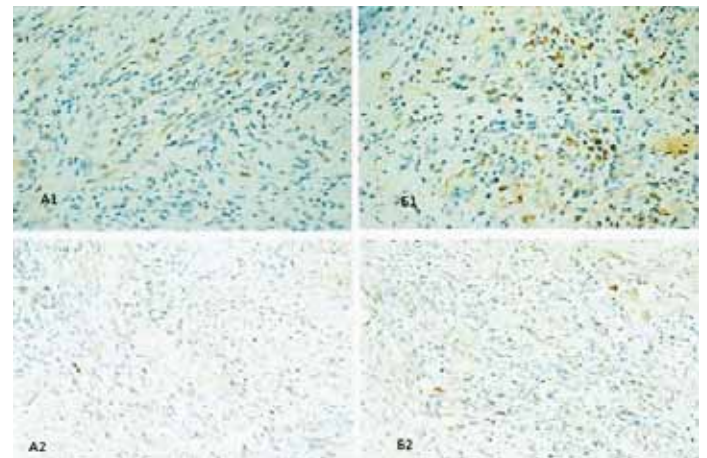


Рис. 11. Иммуногистохимическая картина экспрессии TIMP-1. A1, A2. Слабая экспрессия TIMP-1 в обеих группах до лечения ($\times 200$).

- B1. По данным ИГХ исследования на фоне терапии отрицательным давлением зафиксировано увеличение количества клеток, экспрессирующих TIMP-1 в большей степени, чем в группе контроля (B2). $\times 200$.

судов в дерме (по данным световой микроскопии) было выше в группе пациентов, чьи язвенные дефекты при СДС быстрее эпителизовались [14].

Следствием улучшения микрогемодинамики можно считать существенное уменьшение отека, организацию ЭЦМ, практически полное исчезновение воспалительного инфильтрата и формирование здоровой состоятельной грануляционной ткани, достоверно более выраженные в группе 1 ($p < 0,05$), что подтверждается результатами гистологического и ИГХ исследований.

По результатам ИГХ в группе 1 зафиксировано более выраженное снижение уровня макрофагов, что говорит о переходе раневого процесса из фазы

воспаления в фазу пролиферации. Сходные результаты были получены в исследовании F. Bassetto et al., где к 7-м суткам терапии отрицательным давлением отмечалось существенное снижение маркера макрофагов (CD68) [13] (рис. 9).

Известно, что MMP-9 и TIMP-1 непосредственно участвуют в формировании ЭЦМ. Данные коллагеназы вырабатываются эндотелиальными клетками и фибробластами и участвуют в формировании ЭЦМ и в дальнейшем рубцовой ткани [9–11]. У лиц с раневыми дефектами нижних конечностей и СД соотношение MMP-9/TIMP-1 повышено и является одной из причин замедленного заживления ран [9]. В настоящем исследовании в обеих группах была зафиксирована тенденция к снижению уровня MMP-9, соотношение MMP-9/TIMP-1 было ниже в группе 1 ($p < 0,05$). Можно сделать вывод о том, что на фоне местного применения отрицательного давления происходит лучшая организация ЭЦМ.

Muller M. в своей работе предлагают использовать соотношение MMP-9/TIMP-1 в качестве предиктора заживления ран при СДС [10]. Li Z. в своей работе описали, что соотношение MMP-9/TIMP-1 в раневой жидкости снижалось в ходе успешно проводимого лечения раневых дефектов у лиц с СД2, в отличие от группы пациентов, чьи трофические язвы плохо поддавались консервативному лечению, этот показатель оставался повышенным [15]. По данным исследования Dinh T., получены аналогичные результаты: уровень MMP-9 был значимо повышен у пациентов с плохим заживлением раневых дефектов при СДС по сравнению с группой без СДС и группой, где язвенные дефекты хорошо поддавались консервативному лечению [14] (рис. 10, 11).

Вакуум-терапия может влиять на заживление ран, ингибируя протеазы, однако на сегодняшний день однозначных данных о том, какой эффект преобладает при лечении отрицательным давлением (синтез факторов роста или ингибирование протеаз), нет [16].

Несмотря на небольшой объем выборки больных, на основании полученных данных можно утверждать, что терапия отрицательным давлением эффективно влияет на репаративные процессы в мягких тканях

нижних конечностей у лиц с нарушенным углеводным обменом и может служить методом выбора при подготовке к последующим этапам хирургического лечения.

Однако в настоящий момент количество данных об отдаленных результатах проведенного лечения недостаточно, что требует продолжения исследований.

Выводы

1. Местное использование отрицательного давления (-90 – 120 мм рт.ст.) ведет к более быстрому сокращению глубины раневых дефектов у лиц с различными клиническими формами СДС, что позволяет перейти к следующему этапу лечения в более ранние сроки.
2. Терапия отрицательным давлением (-90 – 120 мм рт.ст.) достоверно повышает локальную оксигенацию мягких тканей ($p < 0,05$), что способствует ускорению процессов заживления раневых дефектов у лиц с нейропатической и нейроишемической формами СДС.
3. Вакуум-терапия сокращает сроки перехода раневого процесса из фазы воспаления в фазу пролиферации, выражается в снижении количества клеток воспалительного инфильтрата, уменьшении отека и организации ЭЦМ по результатам световой микроскопии и в снижении экспрессии маркера макрофагов CD68 по данным ИГХ.
4. Отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня экспрессии MMP-9 и повышение синтеза TIMP-1 под действием вакуум-терапии, что вызывает ускорение организации ЭЦМ и формирования качественной грануляционной ткани.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование проведено при спонсорской поддержке ФГБУ ЭНЦ в рамках утвержденной темы НИР.

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с проведением исследования и публикацией настоящей статьи.

Список литературы

1. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. JAMA 2005;293(2):217–228. doi: 10.1001/jama.293.2.217
2. Зайцева ЕЛ, Токмакова АЮ. Роль факторов роста и цитокинов в репаративных процессах в мягких тканях у больных сахарным диабетом. Сахарный диабет. 2014;(1):57–62. [Zaytseva EL, Tokmakova AY. Effects of growth factors and cytokines on soft tissue regeneration in patients with diabetes mellitus. Diabetes mellitus 2014;(1):57–62.] doi: 10.14341/DM2014157-62
3. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in margin of chronic diabetic foot ulcers. Wound repair and Regen. 2006. 14(5):558–565. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x
4. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet 2005;366(9498):1736–1743. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67700-8.
5. Maruyama K, Asai J, Li M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. Am J Pathol. 2007;170(4):1178–1191. doi: 10.2353/ajpath.2007.060018
6. Gibran NS, Jang YC, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, et al. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated

- with diabetes mellitus. *J Surg Res.* 2002;108(1):122–128. doi: 10.1006/jsre.2002.652
7. Boulton A, Cavanagh P, Raymann G. New and alternative treatments for diabetic foot ulcers: hormones and growth factors. *The foot in diabetes, 4th edition.* John Wiley & Sons, Ltd, 2006. pp. 214–221.
 8. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83(3):835–870. PMID: 12843410
 9. Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2009;32(1):117–119. doi: 10.2337/dc08-0763
 10. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med.* 2008;25(4):419–426. doi: 10.1111/j.1464-5491.2008.02414.x
 11. 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. *J Diabetes Complications.* 2013;27(4):380–382. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.12.007
 12. Morykwas MJ, Simpson J, Pungner K, Argenta A, Kremers L, Argenta J. Vacuum-assisted closure: state of basic research and physiologic foundation. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun; 117(7 Suppl):121S–126S. doi: 10.1097/01.prs.0000225450.12593.12 PMid:16799379
 13. Bassetto F, Lancerotto L, Salmaso R, Pandis L, Pajardi G, Schiavon M, et al. Histological evolution of chronic wounds under negative pressure therapy. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65(1):91–99. doi: 10.1016/j.bjps.2011.08.016
 14. Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, Doupis J, Gnardellis C, Leal E, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes.* 2012;61(11):2937–2947. doi: 10.2337/db12-0227
 15. 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. *J Diabetes Complications.* 2013;27(4):380–382. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.12.007
 16. Зайцева ЕЛ, Токмакова АЮ. Вакуум-терапия в лечении хронических ран. *Сахарный диабет.* 2012; (3): 45–49. [Zaytseva EL, Tokmakova AY. Vacuum therapy for chronic wounds. *Diabetes mellitus.* 2012;(3):45–49.] doi: 10.14341/2072-0351-6085

Зайцева Екатерина Леонидовна

аспирант, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация
E-mail: zai.kate@gmail.com

Доронина Людмила Петровна

к.м.н., с.н.с. отделения диабетической стопы Института диабета, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Молчков Роман Вахтангович

н.с. отделения патоморфологии Института клинической эндокринологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Воронкова Ия Александровна

н.с. отделения патоморфологии Института клинической эндокринологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Митиш Валерий Афанасьевич

к.м.н., зав. отделением ран и раневых инфекций, ФГБУ Институт хирургии им. А.В.Вишневского, Москва, Российская Федерация

Токмакова Алла Юрьевна

д.м.н., г.н.с. отделения диабетической стопы Института диабета ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва; доц. кафедры эндокринологии и диабетологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация