

Комелягина Елена Юрьевна

Синдром диабетической стопы: клинико-морфологические особенности и персонифицированная тактика лечения.

3.1.19. – Эндокринология

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ: СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПРОБЛЕМЕ, ПРИНЦИПАХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ЛЕЧЕНИЮ (обзор литературы).....	19
1.1 Медико-социальная значимость проблемы.....	19
1.2 Эволюция взглядов на патогенез и дифференцированный подход к лечению больных с синдромом диабетической стопы.....	22
1.3 Подходы к ведению больных с синдромом диабетической стопы в настоящее время. Достижения и нерешенные проблемы.....	25
1.4 Особенности процесса заживления хронических ран.....	28
1.5 Современные методы местной терапии язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.....	39
1.6 Роль факторов роста в местном лечении хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	
2.1 Структура работы.....	56
2.2 Материалы исследования.....	58
2.2.1 Критерии включения, невключения и исключения	58
2.2.2 Клиническая характеристика обследованных пациентов.....	62
2.1.3 Клиническая характеристика язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы обследованных пациентов.....	66
2.3 Методы исследования	
2.3.1 Оценка состояния периферической чувствительности.....	71
2.3.2 Оценка состояния магистрального кровотока нижних конечностей...75	

2.3.3	Диагностика синдрома диабетической стопы.....	76
2.3.4	Характеристика язвенных дефектов.....	77
2.3.5	Диагностика осложнений сахарного диабета.....	78
2.3.6	Морфологические методы исследования.....	79
2.1.7	Методы консервативной терапии язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.....	83
2.1.8	Методы статистической обработки данных.....	85
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		88
3.1	Анализ амбулаторного лечения больных с синдромом диабетической стопы.....	88
3.1.1	Анализ исходов лечения язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.....	89
3.1.2	Анализ сроков заживления язвенных дефектов.....	102
3.2	Морфологические особенности язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.....	111
3.2.1	Выявление морфологических фенотипов раневых дефектов при синдроме диабетической стопы.....	112
3.2.2	Анализ молекулярного профиля выявленных морфологических фенотипов.....	116
3.2.3	Анализ клинических, морфологических и иммуногистохимических характеристик хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы разной длительности.....	125
3.2.4	Выявление факторов, определяющих вероятность заживления хронических язвенных дефектов при нейропатической форме синдрома диабетической стопы.....	133
3.2.5	Выявление факторов, определяющих скорость заживления хронических язвенных дефектов при нейропатической форме синдрома диабетической стопы.....	136

ГЛАВА 4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА В ЛЕЧЕНИИ ЯЗВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ В АМБУЛАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ.....	140
4.1 Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами в местном лечении язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.....	140
4.2 Применение эпидермального фактора роста в комплексном лечении больных с синдромом диабетической стопы в амбулаторной практике.....	153
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	165
ВЫВОДЫ.....	171
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	179
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	181
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	183

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Синдром диабетической стопы (СДС) является поздним осложнением сахарного диабета (СД) и одной из основных причин выполнения нетравматических ампутаций нижних конечностей. Стойкая утрата трудоспособности, инвалидизация больных, высокая послеоперационная летальность, повышенный риск потери контралатеральной конечности относят это осложнение к социально значимым. В последние годы интерес к данной проблеме существенно возрос. Следует отметить, что в изучении СДС достигнут значительный прогресс. Обозначены конкретные мероприятия, направленные на снижение количества высоких ампутаций. Внедрение междисциплинарного подхода к ведению данной категории больных привело к снижению количества высоких ампутаций нижних конечностей. Определены факторы, замедляющие заживление хронических ран при СДС [1]. Однако, многие вопросы требуют дальнейшего изучения. Прежде всего, большую озабоченность вызывают сроки заживления ран. По данным литературы на фоне стандартного лечения лишь 20-30% язвенных дефектов эпителизируются за 12 недель лечения [2-4]. В 70-80% случаев сроки заживления составляют год и более [5]. Из клинической практики известно, что часть хронических язвенных дефектов не отвечает на проводимое консервативное лечение и не заживает в течение года и больше. В ряде случаев требуется совместное ведение пациента с СДС с ортопедом или хирургом не для выполнения ампутации, а для малых хирургических вмешательств, необходимых для заживления хронической раны. Однако, алгоритм действий эндокринолога при лечении длительно незаживающих ран с участием смежных специалистов, за исключением сосудистых хирургов, не разработан.

В настоящее время основой дифференцированного подхода к лечению больных с язвенными дефектами при СДС является состояние

магистрального кровотока в артериях нижних конечностей. Однако, раны с достаточным для заживления состоянием магистрального кровотока различаются по целому ряду других характеристик, таких как причина возникновения нарушения целостности кожных покровов стоп, длительность существования и локализация процесса. Эти различия обуславливают не одинаковый ответ на проводимую терапию (как стандартную, так и дополнительную) и не позволяют персонализировать лечение.

Внедрение в клиническую практику дополнительных средств местного лечения язвенных дефектов вызвало большое количество вопросов о их месте в алгоритме лечебных мероприятий. В настоящее время данные об эффективности этого вида терапии противоречивы, а показания и противопоказания к его применению изучены недостаточно и являются предметом для дискуссии.

Таким образом, проблема лечения язвенных дефектов при СДС является актуальной научно-практической задачей и требует поиска новых факторов, позволяющих разработать подходы к персонализации лечебных мероприятий данной категории пациентов.

Степень разработанности проблемы.

В основе персонифицированного подхода лежит выбор лечебных мероприятий на основе индивидуальных особенностей заболевания. В случае с таким социально-значимым осложнением как СДС, речь идет о многофакторном воздействии на течение осложнения и его исходы, который включает вид оказания медицинской помощи (амбулаторный или стационарный), клинические индивидуальные характеристики пациента, морфологические особенности течения раневого процесса.

В настоящее время, достаточно полно изучено негативное влияние на течение хронических ран при СДС таких параметров как недостаточность магистрального кровотока в пораженной конечности, наличие и степень

тяжести инфекции в ране, отсутствие разгрузки при плантарной локализации процесса. Разработаны и стандартизированы лечебные мероприятия с учетом вышеперечисленных состояний [1, 6]. При этом, из клинической практики известно, что существует большая разница в сроках заживления ран без нарушения кровотока и без признаков инфекции (от 30 дней до года и более), а в ряде случаев отсутствия заживления в результате консервативных мероприятий. В этой связи представляет интерес поиск новых параметров, позволяющих выявить дополнительные факторы для персонализации терапии хронических язвенных дефектов при СДС.

Особую актуальность в данном аспекте приобретает изучение патоморфологических особенностей хронических ран, выявление возможных различий в их морфологических фенотипах, анализ иммуногистохимических параметров, влияющих на репарацию. В доступной литературе есть работы, посвященные морфологии репаративных процессов хронических ран, включая язвенные дефекты при СДС [7-10]. Однако подавляющее большинство этих работ выполнено на животных и имеет экспериментальный характер, что не позволяет соотносить их в полной мере с реальной клинической практикой. В отечественной литературе опубликованы работы по изучению патоморфологических особенностей раневого экссудата, кожи, костной ткани у больных с СДС [11-13]. Исследований, оценивающих морфологические особенности хронических ран с точки зрения исхода, выявления параметров влияющих на этот исход, соотнесения морфологических особенностей с клиническими характеристиками нет. Таким образом, данный вопрос недостаточно проработан и освещен в литературе. Между тем, изучение патоморфологических особенностей репарации хронических ран при СДС может послужить основой для персонализации лечебных мероприятий.

В тесной связи с особенностями патоморфологии хронических ран находится вопрос назначения адьювантной терапии для сокращения сроков

заживления язвенных дефектов при СДС. В последнее время особую актуальность приобрела возможность использования инновационных методов лечения язвенных дефектов при СДС. К ним можно отнести применение коллагенов, ростовых факторов; терапию, основанную на клеточных технологиях. Имеющиеся в литературе работы не дают однозначного ответа на вопрос о необходимости их применения и дифференцированном назначении в зависимости от характеристик хронических ран. В этой связи, изучение показаний, противопоказаний и анализ эффективности данных видов лечения может помочь персонализировать назначение этого вида терапии.

Следует отметить, что данных по эффективности оказания специализированной помощи больным с язвенными дефектами при СДС на амбулаторном этапе практически нет. В настоящее время в отечественной литературе опубликована лишь одна работа, анализирующая эффективность оказания помощи таким пациентам в ГБУЗ "Городская поликлиника № 22 Департамента здравоохранения города Москвы [4]. За 18 лет работы отделения диабетической стопы ГБУЗ «Эндокринологический диспансер ДЗМ» с 2002 г. накоплен большой опыт по оказанию специализированной помощи данной категории больным в амбулаторных условиях. Обобщение и анализ этого опыта, базирующегося на международных стандартах, позволят оценить эффективность лечебных мероприятий, проанализировать прогностически значимые факторы исходов течения хронических язвенных дефектов при СДС, определить место дополнительной терапии с точки зрения специализированной догоспитальной помощи больным с СДС.

Таким образом, комплексный, системный подход в оценке системы оказания амбулаторной помощи больным с СДС позволит стратифицировать пациентов с хроническими длительно незаживающими язвенными дефектами при СДС для последующего дифференцированного выбора терапии, включая

совместное ведение врачами смежных специальностей и назначение инновационных методов лечения.

Цель исследования

Разработка персонифицированной тактики оказания амбулаторной специализированной помощи больным с язвенными дефектами при синдроме диабетической стопы с использованием клинико-морфологических подходов.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинические параметры и исходы язвенных дефектов у пациентов с синдромом диабетической стопы, получающих лечение на догоспитальном этапе в специализированном отделении диабетической стопы.
2. Изучить морфологические фенотипы ран и определить исходы течения язвенных дефектов в зависимости от выявленного фенотипа.
3. Проанализировать клинические характеристики пациентов, соответствующие выявленным морфологическим фенотипам язвенных дефектов.
4. Изучить молекулярный профиль язвенных дефектов, соответствующий выявленным фенотипам.
5. Проанализировать прогностическую ценность клинических и морфологических факторов, влияющих на заживление язвенных дефектов при СДС.
6. Оценить эффективность лечения язвенных дефектов с использованием плазмы, обогащенной факторами роста; эпидермального фактора роста.

Объект и предмет исследования

Объект исследования – пациенты сахарным диабетом, осложненным синдромом диабетической стопы. Предмет исследования- клинические и морфологические характеристики язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.

Научная новизна результатов работы

Впервые в Российской Федерации на большом клиническом материале проанализированы результаты лечения пациентов с синдромом диабетической стопы, обратившихся за специализированной амбулаторной помощью.

Определены предикторы заживления и отсутствия заживления, факторы, влияющие на скорость эпителизации язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.

Идентифицированы морфологические фенотипы, различающиеся по соотношению грануляционной, некротической и фиброзной тканей.

Предложено рассчитывать коэффициент репарации для описания морфологической характеристики язвенного дефекта и оценки его репарационного потенциала.

Определен молекулярный профиль каждого фенотипа.

Выявлена зависимость данных морфометрии образца, уровня экспрессии факторов роста в ране и рецепторов к ним, маркеров пролиферации, маркеров наличия в ране собственных клеток, обладающих свойствами стволовых клеток от длительности существования раны.

Доказана и научно обоснована зависимость скорости заживления и исхода лечения хронической раны от выявленного морфологического фенотипа.

Выделены молекулярные предикторы заживления и отсутствия заживления язвенного дефекта при синдроме диабетической стопы.

Предложено оценивать прогноз исхода течения хронических ран при синдроме диабетической стопы по уровню экспрессии ядерного белка Ki67.

Выявлена роль клеток, экспрессирующих рецепторы стволовых клеток (CD34, ALDH1) в течении процесса заживления язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.

Установлена нецелесообразность амбулаторного применения местной терапии язвенных дефектов факторами роста с точки зрения патоморфологических особенностей этих ран.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана и научно обоснована новая концепция подхода к ведению пациентов с синдромом диабетической стопы, основанная на клинико-морфологических особенностях хронических язвенных дефектов стоп.

Сформулирована научная идея персонификации терапии язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы, в основе которой лежит определение морфологического фенотипа хронической раны.

Дана комплексная оценка эффективности специализированной помощи пациентам с синдромом диабетической стопы на амбулаторном этапе. Приведен анализ частоты встречаемости различных форм синдрома диабетической стопы, исходов язвенных дефектов, факторов, влияющих на них. Продемонстрирована высокая эффективность дифференцированного подхода и своевременности оказания специализированной помощи пациентам с различными формами синдрома диабетической стопы.

Предложены новые маркеры заживления язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы. Даны практические рекомендации по дифференцированному ведению таких ран, включая показания к направлению к смежным специалистам.

Разработан алгоритм персонификации терапии язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы, основанный на их морфологических фенотипах.

Предложено использовать в диагностическом алгоритме обследования пациентов с язвенными дефектами при синдроме диабетической стопы иммуногистохимические методы обследования.

Практическая значимость результатов диссертационной работы подтверждается патентами РФ на изобретение «Способ определения прогноза заживления раневого дефекта при синдроме диабетической стопы» (№ 274 2760 от 10.02.21 г.) и «Способ персонификации терапии язвенного дефекта при синдроме диабетической стопы» (№ 2785531 от 08.12.22 г.).

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на структурно-функциональном комплексном подходе, предусматривающим определение клинических и морфологических маркеров заживления хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы. Планирование и проведение исследования осуществлялось в соответствии с базовыми методологическими принципами: комплексность, целостность, объективность, достоверность. Теоретические методы включали в себя научный анализ данных литературы с использованием таких информационных ресурсов как "PubMed", "Mesh Database", "e-library". Все исследования выполнены на высоком методологическом уровне с использованием сертифицированного оборудования. Анализ полученных результатов проводили при помощи программы SPSS 17.0.

Положения, выносимые на защиту

1. Идентифицированы два морфологических фенотипа язвенных дефектов, различающихся по соотношению грануляционной ткани, фиброза и некроза. Выявленные фенотипы значительно отличаются по экспрессии факторов роста и рецепторов к ним, маркерам пролиферации, наличию клеток, экспрессирующих рецепторы стволовых клеток (CD34, ALDH1). Исходы язвенных дефектов, включая заживление или отсутствие заживления, а также скорость эпителизации зависят от их принадлежности к одному из морфологических фенотипов. В этой связи, стратегия и тактика лечения при разных морфологических фенотипах отличаются. Пациенты с язвенными дефектами морфологического фенотипа 1 вида могут получать консервативную терапию согласно стандартам, пациенты с язвенными дефектами морфологического фенотипа 2 вида должны курироваться совместно с хирургами (ортопедами или пластическими).

2. Доказано, что наибольшую прогностическую ценность, определяющую вероятность заживления и его сроки, имеют уровень экспрессии ядерного белка Ki67 (маркер пролиферации), уровень экспрессии CD34 (маркер стволовой клетки и ангиогенеза).

3. Установлено, что назначение факторов роста в качестве местной дополнительной терапии хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы в амбулаторной практике нецелесообразно, так как не имеет преимуществ по сравнению со стандартной терапией.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует шифру специальности 3.1.19. – Эндокринология. Формула специальности - клиническая эндокринология направлена на изучение этиологии и патогенеза эндокринных заболеваний,

диагностики, лечения и профилактики этих заболеваний. Диссертационная работа является комплексным исследованием, позволяющим оценить закономерности и особенности течения раневых дефектов при синдроме диабетической стопы и предложить персонализацию терапии осложнения на основе морфологических фенотипов язвенных дефектов, и соответствует п. 4 и 5 области исследования:

п.4 Этиология и патогенез эндокринных заболеваний, клинические проявления, методы диагностики заболеваний эндокринной системы с использованием клинических, лабораторных, инструментальных и других методов исследования, дифференциальная диагностика различных форм нарушения гормональной регуляции.

п.5 Лечение эндокринных заболеваний: гормонотерапия, химиотерапия, хирургическая коррекция, лучевая терапия, патогенетическая терапия. Разработка новых методов лечения эндокринных заболеваний (генотерапия, поиск локаторов и стимуляторов секреции гормонов и др.).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов определена достаточным объемом выборки (503 язвенных дефекта при СДС, 89 образцов для иммуногистохимического анализа с целью определения морфологических фенотипов), применением современных клинико-морфологических методов исследования, статистических методов для оценки достоверности полученных результатов. Сформулированные выводы и рекомендации соответствуют цели и задачам исследования.

Диссертационная работа одобрена локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 5 от 15.05.2018 г.).

Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедры эндокринологии ФГБОУ ДПО "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Минздрава России 16 июня 2022 года (протокол № 4) .

Результаты исследования доложены и обсуждены на: VI Всероссийском съезде эндокринологов (Москва, 2014 г.), 7 Международном Симпозиуме по диабетической стопе (Гаага, Нидерланды; 2015 г.), 2 Международном научно-практическом конгрессе "Сахарный диабет и хирургические инфекции (Москва, 2015 г.), VII Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2015 г.), XI съезд эндокринологов (Москва, 2015 г.), VII Всероссийском съезде эндокринологов (Москва, 2016 г.), 26 Европейском конгрессе по изучение ран - получена первая премия за устное выступление (Бремен, Германия; 2016 г.), 3 Международном научно-практическом конгрессе "Сахарный диабет и хирургические инфекции" (Москва, 2017 г.), 8 Международном симпозиуме по проблемам диабетической стопы (Гаага, Нидерланды; 2019 г.), IX Национальном диабетологическом конгрессе с международным участием "Сахарный диабет и ожирение- неинфекционные междисциплинарные пандемии XXI века" (Москва, 2022 г.).

Личный вклад автора

Автором лично разработан дизайн исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, положения, выносимые на защиту, обоснована актуальность темы диссертации. Автору принадлежит ведущая роль в постановке проблемы, разработке программы исследования, его методологии. Обработка и интерпретация полученных данных, формулировка основных положений и выводов осуществлена соискателем

лично. Личный вклад автора в изучении литературы, обобщении, анализе клинических материалов и написании диссертации равен 100%.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в клиническую практику работы отделения диабетической стопы ГБУЗ «Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы». Основные положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, где включены в курс лекций и практических занятий.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 научных работы, в том числе 17 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования РФ. 4 публикации в изданиях, входящих в систему SCOPUS Web of Science. Получены патенты на изобретение: № 2742760 от 10.02.21 "Способ определения прогноза заживления раневого дефекта при синдроме диабетической стопы" и № 2785531 от 08.12.22 г. "Способ персонификации терапии язвенного дефекта при синдроме диабетической стопы".

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 рисунками, содержит 55 таблиц. Список литературы включает 203 наименований работ, из них 21 отечественных авторов, 182 – зарубежных авторов.

Благодарности

Глубокая признательность за помощь в выполнении морфологических исследований д.м.н., профессору Института клинической морфологии и цифровой патологии Института клинической медицины им. Н.В.Склифосовского ФГАУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова Коган Евгении Александровне.

ГЛАВА 1

СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ: СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПРОБЛЕМЕ, ПРИНЦИПАХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ЛЕЧЕНИЮ (обзор литературы)

1.1 Медико-социальная значимость проблемы

Сахарный диабет (СД) является хроническим заболеванием, с тенденцией к неуклонному росту. По оценке экспертов в настоящее время у 463 млн. человек в возрасте от 20 до 79 лет диагностирован СД, что соответствует распространенности в 9,6%. К 2045 году общее количество больных СД достигнет 700 млн. человек или распространенности в 10,6% [14]. В Российской Федерации по данным исследования Nation распространенность СД составляет 5,4 % (около 6 млн. чел.) [15]. В связи с ростом количества людей с СД особую актуальность приобретает проблема поздних осложнений этого заболевания: ретинопатии, нефропатии, СДС. Для СДС характерно наличие инфекции, язвы или разрушение глубоких структур стопы, связанное с нейропатией и/или нарушением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей [1]. Есть данные, что ущерб от заболеваемости и смертности от СДС превышает негативные последствия от ряда онкологических заболеваний [16,17]. Если раньше считалось, что приблизительно у 15% больных СД развивается СДС, то последние данные указывают на то, что у каждого третьего пациента СД может развиваться это осложнение [18,19]. Распространенность язвенных дефектов стоп отличается большим разнообразием и зависит от исследуемой выборки (пациенты с СД 1 типа, СД 2 типа или обоих типов), организации помощи пациентов с данным осложнением, уровня экономического развития той или иной страны. В ряде

популяционных исследований было выявлено, что суммарная частота возникновения язвенных дефектов стоп составляет 0,5-4,2 % в год [20-24]. В Российской Федерации распространенность СДС среди пациентов СД 1 типа составила 4,7% и 1,9% у пациентов СД 2 типа [25]

СДС является ведущей причиной ампутаций выше голеностопного сустава, которые выполняются больным СД в 15-40 раз чаще, чем лицам без СД. Частота нетравматических потерь конечностей у больных СД составляет 3,83 случая на 1 тыс. пациентов СД в год, тогда как среди лиц без СД эта цифра в 10 раз меньше: 0,38 случаев на 1 тыс. человек в год [26-28]. Выявлена взаимосвязь между этнической принадлежностью и риском высоких ампутаций. У индейцев, мексиканцев и афроамериканцев этот риск в 1,5-2 раза выше по сравнению с лицами белой расы [20, 26, 29]. Отмечена низкая частота этого показателя у населения Юго-Восточных регионов. Так, в Японии распространенность ампутаций нижних конечностей у больных СД составила лишь 0,6% [30]. В Великобритании частота потерь нижних конечностей среди выходцев из Юго-Восточных стран составила 3,4 на 10 тыс. населения (95% CI 1,1-10,7), тогда как среди лиц европеоидной расы этот показатель был 14,2 случая на 10 тыс. населения (95% CI 1,1-10,7) [31]. В Российской Федерации количество новых случаев ампутаций в год в пересчете на 10.000 взрослого населения в динамике с 2013 до 2016 гг составило: СД1 – 10,5→12,4; СД2 – 9,6→10,9, с выраженной межрегиональной вариабельностью от 0,13 (Бурятия) до 2,9% (Севастополь) при СД1 и от 0,04 (Бурятия, Кабардино-Балкария) до 6,0% при СД2 (Севастополь) [25].

Высокие ампутации значительно увеличивают затраты на лечение больных СД. Стоимость ампутаций существенно отличается в разных странах, возрастает с каждым годом, зависит от уровня ампутации и наличия сопутствующих заболеваний. В нашей стране при выполнении малой ампутации затраты составляют 33,8 тыс. руб., а при большой ампутации

увеличиваются в 5,5 раз и достигают 174,3 тыс. руб. (данные 2013 г., в пересчете на доллары США : 695 \$ и 3600 \$ соответственно) [32].

В Новой Зеландии стоимость ампутации одной конечности составляет 11 тыс.\$, в Нидерландах – 15 тыс.\$, а в Швеции - 43 - 65 тыс. \$ [29, 33]. В США ежегодные затраты, связанные с выполнением высоких ампутаций нижних конечностей, превышают 1,6 млрд. \$. Если суммировать эти данные со стоимостью лечения язвенных дефектов у больных СД в амбулаторных условиях, то общая цифра затрат превысит 6,5 млрд. \$ [34-39]. При этом следует также учитывать не прямые затраты, обусловленные ампутацией, которые включают затраты, связанные со стойкой утратой трудоспособности, услуги социальных служб, длительную реабилитацию. Например, в Великобритании суммарные затраты с учетом ампутации конечности и постампутационным уходом составляют от 0,8% до 0,9% национального бюджета здравоохранения, превышая 900 млн.£ [40]. Кроме того, сам факт ампутации конечности для многих больных является мощным стрессом и фактором, негативно воздействующим на качество жизни [17, 41, 42].

Серьезной проблемой является высокая смертность после ампутаций конечности, которая через год может быть в пределах от 10% до 50%, а через 5 лет от 30% до 80% в случае выполнения высокой ампутации [43, 44]. Кроме того, частота реампутаций через год составляет в среднем 19% (от 5,1 до 31,6%), в последующие 5 лет - 37% (от 27 до 47%) [45].

Помимо высоких ампутаций нижних конечностей, серьезную проблему вызывают сроки заживления язвенных дефектов при СДС. Так, по различным данным заживление в течение 3-х месяцев наступает лишь у 24-34% пациентов [2,4]. В 60-80% случаев сроки заживления составляют год и более [46,47]. Риск рецидивов высок: от 40% в течение года, до 65% в течение 5 лет [5,46]. В этой связи, следует отметить, что длительно существующие и рецидивирующие язвенные дефекты при СДС существенно ограничивают

мобильность пациентов, их возможность не только работать, но и выполнять привычные (рутинные) ежедневные действия, оказывают негативное влияние на качество жизни не только самого пациента, но и окружающих его близких людей [48-52].

Таким образом, СДС является серьезной медико-социальной и экономической проблемой, существенно влияющей на бюджет здравоохранения, особенно при выполнении высоких ампутаций. В этой связи, поиск средств, снижающих как количество высоких ампутаций, так и сроки заживления хронических ран, является актуальной проблемой клинической диабетологии.

1.2. Эволюция подходов к ведению больных с синдромом диабетической стопы

В истории изучения поражений нижних конечностей у больных СД можно выделить несколько этапов. До начала 40-х годов XX века трофические изменения кожных покровов стопы или отдельных ее участков назывались гангреной, а в качестве лечения предлагалась ампутация конечности. В тоже время, уже в конце 30-х годов прошлого столетия стали появляться публикации о различных клинических ситуациях с которыми приходилось сталкиваться на практике: у пожилых пациентов с СД, как правило, поражались акральные участки стопы/стоп, при этом ноги были бледные и холодные. Такая ситуация описывалась как сухая гангрена на фоне атеросклеротического поражения артерий нижних конечностей. У больных же молодого возраста повреждения целостности кожных покровов (трофические язвы) наблюдались на подошвенной поверхности стоп под мозолями, при этом ноги были теплые, а болевых ощущений практически не было. В этом случае существовал риск быстрого распространения инфекции

и последующей ампутации конечности. Обобщив, вышеописанные клинические наблюдения, Lawrence R.D - врач Королевской клиники Лондона, сформулировал концепцию различий в лечении пациентов сахарным диабетом с наличием трофических нарушений стоп. А в 1941 г. , получив разрешение у McKeon K.C. (автора идеи клиновидной резекции пораженного плюснефалангового сочленения и соответствующего ему пальца) он впервые выполнил эту операцию у пациента с сахарным диабетом. [53].

Таким образом, уже к середине прошлого века наметилась отчетливая тенденция в различиях к подходам ведения больных с синдромом диабетической стопы. Были выделены две принципиально разные группы пациентов: с адекватным кровотоком в пораженной конечности и с нарушенным или отсутствующим. Однако, несмотря на то, что уже был опыт успешных оперативных вмешательств в пределах стоп у пациентов с сохраненным магистральным кровотоком, в обоих случаях в качестве лечебной процедуры предлагалась высокая ампутация конечности. Считалось, что у пациентов СД из-за поражения сосудов малого и среднего калибра любые хирургические вмешательства в пределах стоп не только бесперспективны, но и опасны.

В 1984 году была опубликована «революционная» статья Logerfo F. Coffman D., опровергающая теорию окклюзии микрососудистого русла у больных сахарным диабетом. Это открыло возможность для выполнения хирургического восстановления магистрального кровотока в случаях его критического снижения. Стало очевидным, что пациентов с СДС необходимо курировать нескольким специалистам одновременно, а именно: сосудистым хирургам и эндокринологам [54].

Одна из первых работ по оценке эффективности скоординированной работы нескольких специалистов при лечении пациентов с СДС была опубликована в Великобритании. В этой статье был описан опыт

дифференцированного подхода к ведению больных с разными формами СДС и предложено совместное ведение таких пациентов разными специалистами (подиатр, специалист по изготовлению обуви, медицинская сестра, терапевт и хирург). В клинике, где был внедрен такой подход удалось достичь заживления нейропатических язвенных дефектов в 86% случаев, а ишемических в 72%. При этом количество ежегодно выполняемых высоких ампутаций снизилось с 11-12 до 7 [55]. Это означало, что выполнение высоких ампутаций у больных СД можно и нужно предотвращать. В этой связи, одной из задач Сент-Винсентской декларации (1989 г.) было снижение на 50% количества высоких ампутаций у больных сахарным диабетом за 5 лет [56]. С 1991 г. регулярно (1 раз в 4 года) стали проводиться международные симпозиумы по проблемам диабетической стопы. Однако в этот период отсутствовали единые стандарты в терминологии и лечении поражений нижних конечностей у больных СД. Это приводило к большому разнообразию в трактовке, как результатов лечения, так и эффективности применяемых лечебных мероприятий.

С целью разработки научно-обоснованных алгоритмов ведения больных СД с осложнениями нижних конечностей в 1998 г. при Европейской Ассоциации по Изучению Диабета (EASD) была создана рабочая группа по изучению проблем, связанных с диабетической стопой (DFSG). В 1999 г. рабочей группой при участии независимых экспертов было издано Международное соглашение по диабетической стопе переведенное в 2000 г. на русский язык. В 2019 г. вышло последнее издание этого согласительного документа [1]. В этом документе указаны основные принципы профилактики высоких ампутаций нижних конечностей и лечения больных с СДС, которые заключаются в следующем:

- выявление пациентов, имеющих высокий риск образования язвенных дефектов;
- раннее обращение за специализированной помощью;

- междисциплинарный подход к ведению пациентов;
- разгрузка конечности;
- восстановление магистрального кровотока нижних конечностей;
- борьба с инфекцией.

Таким образом, в комплекс рекомендаций входят как меры организационного характера, так и конкретные лечебные мероприятия.

1.3. Подходы к ведению больных с синдромом диабетической стопы в настоящее время. Достижения и нерешенные проблемы

Международные рекомендации по ведению больных с синдромом диабетической стопы учитывают многофакторность осложнения и вовлеченность в лечебный процесс специалистов разных врачебных направлений. Предложены предикторы выполнения высоких ампутаций: систолическое давление на тиббиальных артериях пораженной конечности < 50 мм.рт.ст., лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) < 0,5, давление в пальцевой артерии < 30 мм.рт.ст., транскутанная оксиметрия < 25 мм.рт.ст. Наличие перечисленных признаков у пациента указывает на высокую вероятность выполнения ампутации нижней конечности выше голеностопного сустава и может быть основанием для проведения реваскуляризации в максимально короткие сроки [57]. Применение этих рекомендаций в реальной клинической практике, привело к снижению числа высоких ампутаций во многих странах мира. На основании рандомизированных исследований в разных странах, высокие ампутации снизились на 3 - 85% в период 1982-2011 гг. [58] Согласно суммарным данным по 21 стране, высокие ампутации в общей популяции снизились с 10,8 до 7,5 на 100 тыс. населения (-30,6%). 11 стран опубликовали цифры по снижению высоких ампутаций среди больных сахарным диабетом с 182,9 до 128,3 на 100 тыс. больных СД (-29,8%) [59]. Следует отметить, что в подавляющем большинстве

публикаций снижение высоких ампутаций было связано с внедрением междисциплинарного подхода к лечению пациентов в стационарных условиях. Так, в работе турецких коллег сообщается о снижении общего количества ампутаций после внедрения междисциплинарного подхода с 39,4% до 21,6%. Авторы отмечают, что единственным фактором риска ампутации являлась гангрена. Нарушение магистрального кровотока, гипертония, периферическая нейропатия, остеомиелит и возраст не были ассоциированы с факторами риска ампутации конечности [60]. В наиболее продолжительном (15 лет) проспективном исследовании динамики количества высоких ампутаций в Испании было зафиксировано не только его снижение на 32% после внедрения междисциплинарного подхода, но и поддержание этой тенденции в дальнейшем. Авторы отмечают, что такой длительный период наблюдения показал, что снизить количество ампутаций не получалось до тех пор пока в работу клиники не был окончательно внедрен междисциплинарный подход. В период же становления новой системы в течение 5 лет количество высоких ампутаций оставалось на прежнем уровне [61]. В одном из госпиталей Мадрида внедрение междисциплинарного подхода в условиях клиники позволило достоверно снизить количество высоких ампутаций (6,1 на 100 тыс. населения до внедрения vs 4,0 на 100 тыс. населения после, $p=0,02$) [62].

Между тем, большинство пациентов с СДС получают помощь в амбулаторном режиме. Кроме того, во всех странах независимо от местных особенностей организации медицинской помощи, пациент с СДС первоначально обращается в амбулаторное учреждение. Поэтому, от того как организована помощь на догоспитальном этапе будет зависеть и количество экстренных госпитализаций в запущенных случаях и, соответственно, количество ампутаций. Однако, работ, оценивающих эффективность оказания помощи больным с СДС в амбулаторных условиях, немного. Контингент больных, получающих помощь в амбулаторных и стационарных

условиях, различается. Поэтому задачи, стоящие перед амбулаторной и стационарной службами, также имеют отличия. Если для стационаров ведущим показателем эффективности оказания помощи данной категории больных является количество высоких ампутаций и его динамика, то при оценке эффективности амбулаторной службы, наряду с количеством ампутаций, анализируются сроки заживления язвенных дефектов и частота их рецидивов. Обращает на себя внимание крайне низкое количество работ по оценке эффективности работы амбулаторной службы по оказанию помощи больным с поражением нижних конечностей. Опубликовано всего 3 работы по данной теме. В Ноттингеме (Великобритания) за 6 и 12 месяцев наблюдения заживление наступило в 52% и 59% соответственно, ампутации (без указания уровня) выполнены за год у 8% пациентов [2]. Аналогичная работа была выполнена в Москве. При анализе эффективности работы кабинета «Диабетическая стопа» на базе ГБУЗ «Городская поликлиника № 22», были получены следующие цифры: за 3, 6 и 12 месяцев заживают 34%, 51% и 65% язвенных дефектов соответственно. За год была выполнена 1 (1%) ампутация голени и 6 (8%) ампутаций в пределах стопы [4]. В исследовании Eurodial по оценке эффективности оказания помощи в различных странах Европы получены суммарные данные о том, что язвенные дефекты в течение года заживают в 77% , включая заживление после малых ампутаций, а высокие ампутации выполняются в 5% случаев [63]. Данные о частоте заживлений хронических ран при СДС в разных странах в целом схожи. Согласно этим немногочисленным работам, язвенные дефекты сопоставимые по степени выраженности нарушения кровотока и выраженности нейропатии заживают в разные сроки. Данных по анализу факторов, влияющих на заживление язвенных дефектов и его сроки, нет. Как указывалось выше выявлены маркеры выполнения высоких ампутаций, ассоциированные со степенью снижения магистрального кровотока в пораженной конечности. Определены критерии заживления язвенных дефектов при сохранном и

нарушенном магистральном кровотоке в нижних конечностях. Так, при нейро-ишемической форме СДС прогностически значимыми факторами, влияющими на результат лечения является локальная оксигенация тканей, а при нейропатической- стадия язвенно-некротического процесса [64]. Работы по выявлению предикторов эпителизации хронических длительно незаживающих ран при СДС и сопоставимом кровотоке отсутствуют. Все вышеизложенное указывает на необходимость когортных исследования с участием большого количества пациентов, анализом факторов и выявлением маркеров, влияющих на заживление трофических язв и его сроки

1.4 Особенности процесса заживления хронических ран

Одной из наиболее характерных черт язвенных дефектов при СДС является их склонность к хроническому течению и связанное с этим значительное увеличение сроков заживления. Вследствие вышеописанной ситуации пациент в течение длительного времени не может вести привычный образ жизни. При этом отмечается низкая приверженность к лечению и снижение качества жизни [65, 66]. В данном разделе будут рассмотрены особенности заживления ран у больных с СДС и возможные причины, влияющие на их сроки.

Процесс заживления ран в норме

Независимо от вида и объема раны в процессе заживления раневого дефекта выделяют следующие фазы [67]:

1. фаза воспалительных изменений;
2. пролиферативная фаза;
3. фаза эпителизации.

При неосложненном течении продолжительность фазы воспаления занимает от 3 до 5 суток. Действие патофизиологических механизмов этой фазы направлено на остановку кровотечения и очищение раны от бактериальной инвазии, которая всегда сопровождает не только открытые, но

и закрытые раневые дефекты. Клинические проявления воспалительных изменений (покраснение, отек, повышение локальной температуры, боль) являются результатом действия vasoактивных субстанций: гистамина (синтезируется тучными клетками), серотонина (секретируется тромбоцитами), брадикинина (высвобождается нейтрофилами). Вышеуказанные вещества приводят к обратимому расширению сосудов мелкого и среднего калибра и, как следствие, усиленному притоку клеток иммунологической защиты в очаг воспаления.

Вслед за нейтрофилами, выступающими в качестве линии первой защиты и фагоцитирующими чужеродными агентами, в очаг воспаления прибывают макрофаги. Этим клеткам принадлежит одна из ведущих ролей в сложном многокомпонентном процессе заживления ран. Они принимают участие как в элиминации микроорганизмов, так и в подготовке раневого ложа к началу пролиферативной фазы. Есть данные о существовании двух классов макрофагов, которые различаются по своей функциональной активности. Макрофаги класса M1 представляют противовоспалительный фенотип клеток. M1 макрофаги активируются Толл-лайн рецепторными лигандами 4 –го типа (TLR-4) и интерфероном гамма. Макрофаги класса M2 активируются интерлейкинами (IL-4 и IL-13) и высвобождают факторы роста, принимая тем самым одну из важнейших ролей в фазе репарации [68-71]. Спустя примерно 72 часа после повреждения в рану мигрируют лимфоциты. Они секретируют лимфокины и различные факторы роста [72].

В завершении фазы воспаления, факторы роста, выделяемые макрофагами потенцируют приток в очаг повреждения фибробластов - ключевых клеток следующей фазы заживления, пролиферативной. Кроме того, макрофаги стимулируют пролиферацию соединительной, эндотелиальной и эпителиальной тканей, как непосредственно, так и посредством воздействия на состав экстрацеллюлярного матрикса [73, 74]. Таким образом, макрофаги играют одну из ведущих ролей в борьбе с

элиминацией чужеродных агентов и в подготовке раневого ложа к началу пролиферативной фазы.

Пролиферативная фаза. Патофизиологические механизмы, характерные для данной фазы, направлены на восстановление кровотока и заполнение имеющегося дефекта новой тканью. Ангиогенез и синтез грануляционной ткани - основная характерная черта второй фазы процесса заживления ран. Продолжительность данной фазы при неосложненных условиях составляет от 10 до 30 дней [67].

Грануляционная ткань представляет тонкую сеть вновь образованных сосудов, расположенных во внеклеточном матриксе, который представлен различными клетками: лейкоцитами, лимфоцитами, фибробластами. Фибробласты мигрируют в поврежденный участок из интактной окружающей ткани под воздействием различных факторов роста, вырабатываемых макрофагами. Получены данные о том, что выделенные в настоящее время группы фибробластов, по сути, представляют две популяции клеток, выполняющих разные функции. Один вид этих клеток продуцирует компоненты экстрацеллюлярного матрикса, такие как протеогликаны и коллаген, а другой обладает функциями плюрипотентных мезенхимальных клеток, способных трансформироваться в другие, например в гладкомышечные и адипоциты [75]. Матрицей для синтеза коллагена служит образовавшийся фибриновый сгусток. Коллаген секретируется в экстрацеллюлярный матрикс в виде проколлагена и затем расщепляется на концевые сегменты - тропоколлаген. Тропоколлагены соединяются и образуют прочные нити коллагена. Стабильность (прочность) коллагеновых волокон зависит от межмолекулярных соединений, которые определяют устойчивость коллагена к разрушению [72].

Миграция фибробластов задерживается при наличии в ране некротических тканей, гематом, бактериального загрязнения. Таким образом,

репаративные процессы (репарация) не может начаться при незавершенном процессе очищения в первой фазе.

Ключевая роль в синтезе эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю стенку вновь образованных сосудов, принадлежит предшественникам эндотелиальных клеток (ПЭК). ПЭК были открыты в конце 1990-х годов. Их маркером является экспрессируемый на поверхности антиген CD34 [76]. Ранее считалось, что в норме незрелые ПЭК мигрируют из костного мозга в очаг повреждения, где под влиянием микроокружения дифференцируются и являются источниками проангиогенных цитокинов [77]. В настоящее время доказано, что ПЭК не являются истинными прогениторными клетками, а принадлежат к миелоидным клеткам, которые потенцируют рост сосудов посредством секреции проангиогенных факторов паракринным механизмом [78].

Особая роль в заживлении ран принадлежит гемопоэтическим/прогениторным клеткам (ГПК). Резервуаром для них является костный мозг. Среда костного мозга, в которой находятся ГПК не является однородной, формируя особые условия для их созревания на разных стадиях, так называемые ниши ГПК [79]. Клетки костного мозга обеспечивают регулярную транспортировку ГПК в системный кровоток и обратно. Ниши ГПК имеют хорошо развитую автономную иннервацию симпатическими нервными волокнами. Именно симпатические волокна обеспечивают как немедленное, так и циркадное высвобождение ГПК в кровоток [80] Это чрезвычайно важно, так как ГПК являются источником ключевых клеток, обеспечивающих репарацию тканей. Любые нарушения нейронального взаимодействия ниш ГПК и клеток костного мозга могут привести к недостаточному ответу организма на повреждение, о чем будет сказано дальше. Доказано, что назначение гранулоцит-колоний стимулирующего фактора (ГКСФ) индуцирует мобилизацию ГПК

посредством активации норадренергических рецепторов, что также подтверждает нейрональный механизм регуляции ГПК [81].

Следует отметить, что в процессе заживления не только ПЭК, но и другие клетки-предшественники играют важную роль [72]

С течением времени, клеточные элементы, содержащиеся в экстрацеллюлярном матриксе грануляционной ткани замещаются соединительнотканными структурами.

Фаза эпителизации. Данная фаза завершает процесс заживления и является самой продолжительной. Ее длительность, даже при неосложненном течении может достигать 60 суток. Эпителизация начинается со структурных изменений клеток, локализованных у краев раны, позволяющих им начать миграцию. Процесс движения эпителиальных клеток сопряжен с изменением их заряда, что в свою очередь приводит к полимеризации внутриклеточного актина для формирования псевдоподий. Для того чтобы клетка передвигалась, формирование псевдоподий должно иметь направленный характер. Если псевдоподии образуются в диаметрально противоположных направлениях или вокруг клетки, то движения клетки не происходит [75].

Миграция клеток осуществляется по ровной поверхности, то есть адекватный процесс эпителизации предполагает, что имеющийся дефект будет заполнен грануляционной тканью полностью. В противном случае, клетки эпителия не смогут перемещаться. В процессе заживления грануляционная ткань преобразуется в рубцовую [67, 82].

Таким образом, процесс заживления раны состоит из следующих основных компонентов:

1. тромбоз с целью *остановки кровотечения*;
2. мобилизация нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления для *элиминации* инородных веществ, включая, бактерии и подготовке раневого ложа к заполнению новой тканью.

3. ангиогенез, формирование *грануляционной ткани* и заполнение ею раневого дефекта;

4. *эпителизация* и образование рубца.

Если рана не заживает в нормальной временной последовательности, тогда она считается хронической. Хронизация процесса заживления раны (превращение острой в длительно незаживающую) может произойти на любой стадии ее репарации. При СДС раневой дефект проходит те же стадии заживления, что и любая другая рана. Однако, течение всех фаз заживления нарушается. При этом следует подчеркнуть, что на процесс заживления язвенных дефектов при СДС оказывает влияние множество факторов.

Диабетическая нейропатия. У пациентов СД поражается как сенсомоторный, так и автономный компоненты нервной системы. Диабетическая дистальная сенсо-моторная нейропатия являясь основным фактором риска развития СДС, вносит существенный вклад в патогенез возникновения язвенных дефектов. Кроме того, наличие сенсо-моторной нейропатии ухудшает восприятие и оценку пациентом признаков инфекции, что отрицательно сказывается на своевременности оказания медицинской помощи [83]. Было выявлено, что сенсорные нервные окончания, иннервирующие кожу, включая дерму и эпидермис, высвобождают целый ряд нейропептидов, включая субстанцию П [84]. Эти нейропептиды стимулируют пролиферацию клеток, вовлеченных в процесс заживления и высвобождения факторов роста, способствуют клеточному хемотаксису. Уровень нейропептидов регулируется рядом специфичных пептидаз, включая нейтральную эндопептидазу [84, 85]. У пациентов СД, включая больных с СДС плотность нервных волокон в дерме снижена [86-88]. Это сопровождается снижением высвобождения нейропептидов [89, 90]. Низкая концентрация нейропептидов может быть также результатом недостаточного количества нейротрофных факторов роста и повышенной активности нейропептидаз, которая провоцируется прямым токсическим воздействием

гипергликемии [91, 92]. Негативный вклад в процесс заживления ран у больных СД вносит автономная нейропатия (АН). АН приводит к денервации сосудистой стенки и формированию артерио-венозных шунтов. В результате артерии мелкого и среднего калибра теряют возможность к дополнительному расширению и соответственно обеспечению очага повреждения клетками иммунологической защиты. Есть данные о нарушенной функции лейкоцитов, неадекватной миграции нейтрофилов и макрофагов в рану в сочетании со сниженным хемотаксисом лейкоцитов [93, 94]. По этой же причине, локальные признаки инфицирования раны проявляются менее ярко. Кроме того, было выявлено, что у больных СД нарушена возможность симпатических нервов вызывать мобилизацию гемопоэтических клеток из костного мозга посредством гранулоцит-колоний стимулирующего фактора [95]. Безусловно, неадекватная реакция стволовых клеток на повреждение является ключевым механизмом запуска каскада недостаточного ответа основных клеток, принимающих участие в заживлении раны.

В результате всех вышеописанных изменений создаются условия как для беспрепятственного и быстрого распространения инфекции, так и создания условий для замедления заживления и хронизации процесса.

Нарушение магистрального кровотока в артериях нижних конечностей у больных СД приводит к ишемии тканей, создает условия для последующего инфицирования язв с отсутствием возможности развития адекватной воспалительной реакции. К тому же, в условиях воспаления возникает отек тканей, который дополнительно сдавливает окклюзированные артерии и усугубляет ишемию. Необходимо отметить, что для эффективного процесса очищения необходимо адекватное количество молекулярного кислорода. Есть данные, что при падении транскутанного напряжения кислорода ниже 40 мм.рт.ст. макрофаги инактивируются [96]. Кроме того, недостаточная оксигенация тканей приводит не только к нарушению функциональной способности лейкоцитов, но и к снижению выработки

коллагена и замедлению эпителизации. Ангиогенез, протекающий одновременно с фазой пролиферации, характеризуется временно повышенной скоростью метаболизма, и, следовательно, требует обильного кровоснабжения. В отсутствие последнего поступление макрофагов и фибробластов в ложе раны прекращается, что препятствует регенерации ткани [67, 96].

Повышенный уровень глюкозы крови негативно влияет практически на все стадии заживления. Выявлено, что высокий уровень глюкозы плазмы ассоциирован со снижением ряда факторов системы комплемента, что нарушает гуморальный иммунитет и способность организма противостоять инфекции [97-99]. В эксперименте, местное применение глюкозы снижает ангиогенез и формирование грануляционной ткани [100]. Гипергликемия ингибирует пролиферацию фибробластов, кератиноцитов. Кроме того, под воздействием высокого уровня глюкозы происходит десенсибилизация фибробластов к стимуляции факторами роста (202-204). В условиях гипергликемии увеличивается апоптоз эндотелиальных клеток, что приводит к повышенному скоплению лимфоцитов в сосудистой стенке, их последующей миграции в очаг повреждения и отсроченный противовоспалительный ответ, что вносит свой негативный вклад в процесс заживления [72]. Доказано, что высокий уровень глюкозы снижает возможность лейкоцитов мигрировать в зону воспаления и поглощать микроорганизмы. Необходимо отметить, что в условиях нормогликемии у больных СД подобных нарушений, как правило, не бывает [101].

Конечные продукты гликирования имеют высокое сродство к нейтрофилам, в результате чего эти клетки не могут достичь зоны поражения, что неизбежно влечет за собой быстрое распространение инфекционного процесса и замедление скорости течения первой фазы [102]. У больных СД была выявлена высокая экспрессия рецепторов к конечным продуктам гликирования на мембране фибробластов [75]. В эксперименте

продемонстрировано, что конечные продукты гликирования подавляют пролиферацию фибробластов [103]. Кроме того, в многочисленных исследованиях доказано, что культивирование дермальных фибробластов в среде с высоким уровнем глюкозы и наличием конечных продуктов гликирования приводит к подавлению пролиферации, снижению синтеза коллагена и гиалуроновой кислоты, нарушению экспрессии или активности провоспалительных цитокинов и факторов роста [75].

Влияние **факторов роста**, присутствующих в организме в небольших количествах и участвующих в нормальном процессе заживления, при СД изменяется.

Факторы роста, стимулирующие процесс ангиогенеза, пролиферации, формирования компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), в хронических ранах подвергаются разрушающему действию протеаз, уровень которых значительно превышает нормальные показатели. При этом протеолизу подвергаются не только факторы роста, но и рецепторы к ним, а также компоненты ВКМ [104].

Роль матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в процессе заживления ран. Матриксные протеиназы относятся к семейству Zn-зависимых эндопептидаз, которые обеспечивают деградацию белковых компонентов межклеточного матрикса и базальных мембран. В настоящее время описано, более 20 различных ММП человека. На основании первичной структуры, субстратной специфичности и клеточной локализации эти ферменты делят на четыре основные подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины и мембраносвязанные ММП.

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП) регулируют ферментативную активность ММП и их активацию. Нормальным условием течения физиологических процессов в ране является поддержание равновесия между активностью ММП и их ингибиторов. Нарушение этого равновесия может оказывать негативное воздействие на

состав межклеточного матрикса и влиять на различные функции клеток, включая их способность к адгезии, миграции и дифференциации. Таким образом, ММП и ТИМП можно рассматривать в качестве биохимических маркеров, позволяющих количественно оценивать процесс регенерации трофических язв при СД. В настоящее время созданы и продолжают разрабатываться перевязочные материалы, влияющие на уровни ММП и ТИМП в ране [107].

У больных с хроническими трофическими нарушениями нижних конечностей повышен уровень ММП, снижены уровни ТИМП, что приводит к нарушению фаз репарации и изменению процессов регенерации [108- 110].

Есть данные, что снижение уровня ММП более, чем в 2 раза свидетельствует о положительной динамике репаративных процессов, а отсутствие изменений в их количестве указывает на замедление эпителизации [107].

Другие факторы. Отрицательное влияние на репаративные процессы оказывают и другие факторы, в частности, печеночная, почечная и сердечная недостаточность, вызывающие появление окolorаневых отеков. При этом кожные покровы становятся более подверженными бактериальной инфекции. Выявлено достоверное снижение скорости эпителизации язвенных дефектов у больных с сопутствующей нефропатией [109, 111]. Снижение остроты зрения у больных диабетом препятствует раннему обнаружению и должному уходу за поврежденной кожей.

Таким образом, у больных СД, осложненного наличием СДС, за счет комплексного негативного воздействия указанных выше факторов нарушается течение всех фаз заживления раневого дефекта. Прежде всего, первая фаза (воспалительных изменений) принимает затяжной характер вследствие того, что клетки (нейтрофилы, макрофаги), играющие ключевую роль в процессе очищения, не могут адекватно выполнять свою функцию в условиях гипергликемии. Как в эксперименте, так и у больных с СДС

доказан дисбаланс содержания макрофагов разных фенотипов M1 и M2 [112 - 114]. Еще одним маркером хронических язвенных дефектов является наличие в их составе свободных радикалов, разрушающих клеточные элементы раны, подавляющих активацию лейкоцитов и ангиогенез [115 - 118]. При незавершенной фазе воспаления, наличии в ране чужеродных агентов и некротических масс отсутствуют условия для начала второй фазы – регенерации. Доказано, что характерной особенностью длительно незаживающих хронических язвенных дефектов является их инфильтрация чрезмерным количеством нейтрофилов [119, 120]. Нейтрофилы высвобождают множество ферментов, препятствующих полноценным процессам репаративной регенерации. В частности коллагеназа разрушает матрикс соединительной ткани, а эластаза ряд важнейших факторов роста – СЭФР, ТФР-β1 [121-123]. Функциональная активность основных клеток второй фазы – фибробластов, снижена. Пролиферация, дифференциация и миграция кератиноцитов недостаточна, а продукция ТФР-β3, подавляющего миграцию дермальных клеток повышена [124, 125]. С другой стороны, аккумуляция конечных продуктов гликирования индуцирует чрезмерную продукцию TNF-α макрофагами на поздних стадиях повреждения, что значительно замедляет эпителизацию [72]. В результате этого не происходит полноценного синтеза грануляционной ткани и последующей эпителизации и создаются условия для заполнения язвенного дефекта фиброзной тканью.

Таким образом, в настоящее время накоплена достаточная доказательная база, объясняющая на клеточном и молекулярном уровнях причины длительных сроков заживления язвенных дефектов при СДС. Однако, следует отметить, что подавляющее большинство работ выполнено в эксперименте, без учета клинических особенностей пациентов страдающих СД, осложненным язвенными дефектами нижних конечностей. Нет работ, оценивающих морфологические особенности хронических язвенных дефектов при СДС, включая повреждения разной длительности

существования, разной локализации и размеров. Кроме того, в реальной клинической практике, известно, что, несмотря на множество факторов оказывающих негативное воздействие на процесс репарации, сроки эпителизации при прочих равных условиях могут значительно отличаться. При этом, часть язвенных дефектов заживает в сроки до 20 недель. В этой связи, необходимы исследования по выявлению морфологических особенностей хронических ран, заживающих в разные сроки, и факторов, оказывающих то или иное влияние на сроки эпителизации.

1.5 Дополнительные методы лечения язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.

В предыдущем разделе были представлены данные, объясняющие патогенез длительных сроков заживления язвенных дефектов при СДС. С целью воздействия на различные компоненты процесса репарации ведется поиск средств, способных устранять незавершенное воспаление, стимулировать миграцию и пролиферацию клеток, участвующих в регенерации тканей. В настоящее время в клинической практике разных стран применяются следующие виды дополнительной к стандартной терапии язвенных дефектов при СДС: вакуум-ассоциированное лечение (ВАК), применение различных типов эквивалентов кожи (ЭК), терапия с использованием факторов роста.

ВАК терапия основанная на способности отрицательного давления удалять раневой экссудат и ликвидировать интерстициальный отек, давно используется как в стационарных, так и в амбулаторных условиях лечения ран, включая хронические. В настоящее время ВАК терапия подтвердила эффективность при лечении послеоперационных ран при СДС и не рекомендована для применения в других ситуациях [126]

Эквиваленты кожи. Кожа состоит из трех слоев: тонкий, наружный слой клеток- эпидермис с кератиноцитами; более плотный средний слой – дерма, представлен соединительной тканью, содержит волосяные фолликулы, потовые и сальные железы, кровеносные сосуды; внутренний слой – подкожно-жировая клетчатка. ЭК были разработаны в качестве альтернативы аутодермопластики. В идеале ЭК должен плотно прилегать к раневому ложу, не обладать токсичностью и иммуногенными свойствами, не вызывать воспалительные реакции, обладать возможностью к биодegradации, способствовать восстановлению полноценной кожи со свойственными ей физическими и механическими характеристиками. В частности, предотвращать потерю жидкости и тепла и защищать рану от инфекции. Существует множество классификаций ЭК в зависимости от различных параметров, таких как анатомическая структура, продолжительность действия, тип биоматериала, наличие клеточного компонента [127, 128] Широкое применение получили ЭК, содержащие клетки, полученные из плаценты. Плацента не экспрессирует гены системы HLA в связи с чем не происходит отторжения при ее трансплантации [129]. При этом она содержит фетальные фибробласты, мезенхимальные стромальные клетки, эпителиальные клетки, является источником внеклеточного матрикса, высвобождает массу факторов роста, включая эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста, высвобождаемый тромбоцитами (PDGF), трансформирующий фактор роста β (TGF- β) [130,131]. Эффективность применения ЭК, полученных из плаценты доказана как в рандомизированных, сравнительных, контролируемых исследованиях, так и в наблюдательных проектах [132-135, 126].

Культивированная дерма человека – результат роста фибробластов в специальной биодegradируемой среде. Эффективность подтверждена в небольшом количестве работ, выполненных с рядом методологических

нарушений, в связи с чем в настоящее время эксперты рекомендуют с осторожностью относиться к оценке результатов. Более сложная разновидность кожного лоскута состоит из эпидермального фрагмента лоскута, образованного человеческими кератиноцитами и слоя дермы, представленного человеческими фибробластами в матриксе бычьего коллагена типа I. Помимо не очень корректного с точки зрения лучшей клинической практики дизайна выполненных работ, эксперты указывают на недостаточную ясность с экономической целесообразностью данного вида терапии [126]

1.6. Роль факторов роста в местном лечении хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы

Обширное семейство различных факторов роста (ФР) играет ключевую роль в процессе заживления ран на всех стадиях процесса. ФР являются полипептидами, реализуют свои действия через паракринный, аутокринный и эндокринный пути передачи сигнала. Связываясь со специфическими рецепторами клеточной поверхности, они стимулируют хемотаксис и клеточную пролиферацию, обеспечивая взаимодействие клеток различных типов, контролируют формирование внеклеточного матрикса (ВКМ) и ангиогенеза, регулируют процессы эпителизации [136- 138]. В таблице 1 приведены данные о факторах роста, участвующих в процессе заживления раневых дефектов.

Таблица 1. Факторы роста, источник их происхождения, точки приложения [106]

Фактор роста	Источник синтеза	Точки приложения (механизм действия)
ТрФР	тромбоциты	Хемоаттракция и митогенная активность для фибробластов, гладкомышечных клеток, макрофагов, клеток воспаления.

ТФР- α	эндотелий, фибробласты, макрофаги, кератиноциты, гепатоциты, эозинофилы	Митогенный потенциал для кератиноцитов и фибробластов. Принимает участие в ангиогенезе.
ТФР- β	тромбоциты	Хемоаттракция для нейтрофилов, макрофагов, фибробластов, стимулирует синтез коллагена, образования грануляционной ткани, реэпителизацию.
СЭФР	эндотелий	Потенциальный митоген для эндотелиальных клеток.
ЭФР	тромбоциты, почки, слюнные железы, слезные железы	Увеличивает количество фибробластов в ране, способствует регенерации эпидермиса.
ФРФ	фибробласты, эндотелий, гладкомышечные клетки, хондроциты	Митогенный потенциал для эндотелиальных клеток. Принимает участие в ангиогенезе.
ФРК	фибробласты	Стимулирует синтез кератиноцитов
ИФР	печень, легкие, сердце, поджелудочная железа, мозг, мышцы	Стимулирует синтез гликогена и транспорт глюкозы и аминокислот через клеточную мембрану. Увеличивает синтез коллагена фибробластами.

ТрФР-тромбоцитарный фактор роста; ТФР- $\alpha\beta$ - трансформирующие факторы роста α и β ; СЭФР-сосудистый эндотелиальный фактор роста; ЭФР-эпидермальный фактор роста; ФРФ - фактор роста фибробластов; ФРК - фактор роста кератиноцитов; ИФР- инсулиноподобный фактор роста.

На ранних стадиях первой фазы течения раневого процесса источником ФР являются активированные тромбоциты. Они высвобождают тромбоцитарный фактор роста (ТрФР), трансформирующие факторы роста α

и β (ТФР- α , TGF- β -), тромбоцитарный фактор 4 [72,106]. ТрФР и ТФР- β стимулируют приход макрофагов, играющих одну из ведущих ролей в борьбе с элиминацией чужеродных агентов и в подготовке раневого ложа к началу пролиферативной фазы. Макрофаги выделяют ФР, ответственные за ангиогенез, приток к очагу повреждения фибробластов - ключевых клеток следующей, пролиферативной фазы заживления раны. Фибробласты ответственны за синтез компонентов ВКМ, включая коллаген, Вырабатывают факторы роста фибробластов (ФРФ) и кератиноцитов (ФРК), которые модулируют миграцию и пролиферацию клеток, участвующих в репарации и эпителизации раны [72, 139]. Во время пролиферативной фазы заживления ран происходит клеточная дифференцировка. При этом, часть клеток трансформируется в клетки с другим фенотипом, морфологией и функциями, например эндотелиально-мезенхимальная или эпителиально-мезенхимальная трансформация [140, 141]. Ведущая роль в данном процессе принадлежит факторам роста, в частности трансформирующему фактору роста бета (ТФР- β) [142].

У пациентов с СДС, как указывалось выше, нарушены все фазы заживления раны. Одной из причин данной ситуации является дефицит факторов роста, цитокинов, хемокинов, ответственных за инициацию и последующее поддержание репаративных процессов в ране. Получены данные о сниженном содержании у больных с СДС следующих факторов роста и рецепторов к ним: фактор роста кератиноцитов (ФРК), трансформирующий фактор роста β (ТФР- β), тромбоцитарный фактор роста (ТрФР), сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР), фактор роста нервов (ФРН), интерлейкины: IL -8, IL-10, IL-15, нейротрофин- 3 (НТ-3) [72, 106, 139].

Учитывая ведущую роль ФР в различных фазах заживления ран и дефицит последних у больных с СДС вопрос об использовании

лекарственных препаратов на основе ФР является актуальной проблемой клинической эндокринологии и хирургии. В данном разделе рассматриваются данные об эффективности применения ФР в терапии язвенных дефектов у больных с СДС.

Эпидермальный фактор роста

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) был открыт в слюнных железах мыши в 1962 г. [143]. Он секретируется тромбоцитами, макрофагами, моноцитами и фибробластами. ЭФР стимулирует продукцию фибронектина (один из компонентов ВКМ), не влияет на продукцию коллагена, воздействует на эпидермальные и гладкомышечные клетки, а также фибробласты, используя аутокринный и паракринный пути передачи сигнала [144, 145]. ЭФР связывается со своими рецепторами, которые расположены в базальном слое эпидермиса, приводя к димеризации и аутофосфорилированию последнего [146]. В результате, увеличивается пролиферация и миграция эпителия в рану, стимулируется выработка фибронектина и увеличение числа фибробластов в ране [147]. В эксперименте на животных было продемонстрировано, что ЭФР способствует регенерации эпидермиса у свиней и эпителизации роговицы у кроликов [106].

В одном из первых клинических рандомизированных исследований, эффективность ЭФР в виде крема оценивалась на донорских участках забора кожи для последующих пластических операций. Было выявлено, что ЭФР уменьшает время заживления раны на 1,5 дня. Разница оказалась достоверной, но с клинической точки зрения такое снижение значения не имело [148]. Обзор данных литературы относительно использования ЭФР при СДС выявил значительную неоднородность, как дизайна исследований, так и полученных данных по эффективности. В таблице 2 приведены

результаты исследований по оценке эффективности ЭФР в лечении язвенных дефектов при СДС.

Таблица 2. Исследования по оценке эффективности эпидермального фактора роста в лечении язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы

Исследование	Дизайн	Лекарственная форма ЭФР	Количество пациентов	Глубина язвенных дефектов по Вагнеру	Результат
Tsang et al., Китай [149]	Р, К, ДС, наблюдение- 1 год	Крем с 0.02% или 0.04% ЭФР	61 [3 группы: 19 (крем Актовегин), 21 (0.02% ЭФР и крем Актовегин), 21 (0,04% ЭФР и крем Актовегин)]	I-II	Крем с 0.04% ЭФР с кремом Актовегин ускоряет заживление
Acosta et al., Куба [147]	НР, НК только в стационаре	Внутритканевые инъекции 25 мг в шприце	29	III-IV	Увеличение грануляционной ткани в ране
Hong et al., Корея [150]	П, О	Спрей с 0.005% ЭФР	89 (21-станд. лечение; 68-ЭФР)	II-III	Заживление в 76% случаев за 46 дней
Viswanathan, Pendsey, Индия [151]	К, Р, ДС, МН	Гель со 150 мг/г ЭФР	60 (плацебо -30; ЭФР-30)	НД	Гель с ЭФР ускоряет заживление
Fernandez-Montequin et al., Куба [152]	Р, НК, ДС, МН, наблюдение – 1 год	Внутритканевые инъекции 75 или 25 мкг ЭФР в шприце	41 (1: 23- 75 мкг ЭФР; 2:18 – 25 мкг ЭФР)	III-IV	Большее количество пациентов с увеличением грануляционной ткани (> 50%) в

					группе 75 мкг ЭФР (p< 0.00).
Tuyet et al., Вьетнам [153]	НК, наблюдение 8 недель	Спрей с 0.005% ЭФР	28	II-III	Заживление в 56,5 % случаев за 39 дней
Fernandez-Montequin et al., Куба [154]	Р, К, ДС, Мн, наблюдение – 1 год	Внутритканевые инъекции 75 мкг или 25 мг ЭФР в шприце	149 [3 группы: 53 (75 мкг ЭФР); 48 (25 мкг ЭФР); 48 (плацебо)]	III-IV	Тенденция к более раннему и полному ответу (> 50% грануляционной ткани, покрывающей поверхность раны) при 75 мкг ЭФР
Fernandez-Montequin et al., Куба [155]	НР, НК, до полного заживления	Внутритканевые инъекции 75 мкг в шприце	20	II, III, IV	Полное заживление достигнуто в 54% случаев за 20 недель
Gomes-Villa R. et al. [156]	Р, К, ДС	Внутритканевые инъекции 75 мкг в шприце	30 (15-плацебо; 15-ЭФР).	I-II	Большее количество заживших ран (4 vs 0, p=0.033) и значительное снижение размеров (12,5 vs 5,2 см ² , p=0,049) при 75 мкг ЭФР

Р - рандомизированное, НР – нерандомизированное, К - контролируемое, НК - неконтролируемое, ДС - двойное слепое, П - проспективное, О - открытое, Мн– многоцентровое, НД- нет данных

Согласно представленным данным, ЭФР может применяться в виде крема, геля, спрея и внутриваневых инъекций. В исследования включались пациенты как с поверхностными ранами (степень по Вагнеру – I), так и с остеомиелитом (III степень по Вагнеру) и некрозом всех слоев кожи или гангреной (IV степень по Вагнеру). При этом, нет ясности каким образом применяется препарат при гангрене. Следует отметить, что исследователи по-разному оценивали эффективность применения ЭФР. В работах по местному применению ЭФР в виде геля, крема или спрея первичной конечной точкой было количество заживших ран за определенный период времени [149-151, 153]. Практически во всех работах по внутриваневым инъекциям ЭФР в качестве первичной конечной точки использовался процент грануляционной ткани в ране, что является субъективным параметром и не свидетельствует о самом факте заживления раны и его сроках [147, 152, 154-156]. Согласно данным, представленным в таблице, вне зависимости от лекарственной формы ЭФР и глубины раны по классификации Вагнера во всех работах отмечено положительное влияние препарата на заживление язвенных дефектов при СДС. Однако в настоящее время полученные данные не дают возможности сделать однозначный вывод о клинической эффективности ЭФР в плане сроков полной эпителизации язвенных дефектов при СДС.

Плазма, обогащенная тромбоцитами.

Как указывалось выше, основным источником ФР при заживлении ран являются тромбоциты. После нарушения целостности кожных покровов, наряду с вазоконстрикцией происходит агрегация тромбоцитов с целью остановки кровотечения и высвобождения из α -гранул тромбоцитов различных ФР, необходимых для заживления раны: фактор роста, содержащийся в тромбоцитах (ТрФР), трансформирующий фактор роста - β (ТФР- β), сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР), эпителиальный

фактор роста (ЭФР). Также, в α -гранулах содержатся фибриноген, фибронектин и витронектин [157, 158].

Метод обогащения тромбоцитами собственной плазмы крови основан на дегрануляции α -гранул с высвобождением содержащихся в них различных ФР. В качестве активатора может выступать CaCl_2 , тромбин или глюконат кальция. Кровь пациента предварительно центрифугируется. Ее количество зависит от размера раны (как правило от 5 до 20 мл), но возможно применение как меньшего, так и большего количества крови. В результате центрифугирования цельной крови образуются 3 слоя: 1-ый слой - плазма, содержащая низкое количество тромбоцитов («бедная» плазма); 2-ой слой - плазма, содержащая большое количество тромбоцитов («богатая» плазма); 3 слой - эритроциты. Впоследствии первый и второй слои плазмы, подвергаются активации, которая заключается в дегрануляции α -гранул с высвобождением ФР. Активированная плазма помещается в термостат в стеклянных емкостях на 35-45 минут. В результате этой процедуры образуется гель, который накладывается в виде аппликации на рану.

Первые работы по оценке эффективности данного метода были опубликованы около 30 лет назад [159-162]. Результаты оказались противоречивы, однако было сделано важное заключение, что данный метод может применяться только в качестве дополнительного к стандартному и у очень небольшого количества пациентов. Использование его в качестве альтернативы стандартному лечению не имеет смысла [106].

Следует отметить, что работ, посвященных оценке клинической эффективности данного метода не так много. Так, по результатам одного систематического обзора, в котором проанализировано 1165 тезисов, относящихся к применению аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, лишь 11 исследований были включены в окончательный анализ. Подавляющее большинство работ выполнялись в эксперименте и относились к теоретическим, а не клиническим исследованиям. По данным обзора 90%

язвенных дефектов, на которые наносились аппликации плазмы, обогащенной тромбоцитами заживали за $7,8 \pm 2,7$ недель, а в группе контроля за $8,3 \pm 3,7$ недель (разница была недостоверной, $p=0,115$). При этом скорость заживления была достоверно выше в группе, получающей лечение плазмой, обогащенной тромбоцитами [$0,68 \pm 0,56$ vs $0,39 \pm 0,09$ (см²), $p < 0,001$]. Это дало основание авторам сделать заключение о преимуществе метода перед использованием только стандартной терапией [163]. Однако необходимо отметить, что уровень доказательности, полученных данных в анализируемых в обзоре работах был невысок: лишь одна работа была рандомизированным, двойным-слепым плацебоконтролируемым исследованием. Методика аппликации была различной: в одних работах гель с плазмой наносился 1 раз, в других 2 раза в неделю. В одной из работ - 5 раз за 12 недель. Такой важный показатель, как продолжительность существования раны до включения в протокол указан в 7 из 11 работ, а в сравнении с группой контроля лишь в 3-х. Средний размер ран был достоверно больше в группе, которым наносился гель с плазмой, обогащенной тромбоцитами. На основании данного обзора можно сделать заключение о необходимости дальнейших исследований по отработке единого протокола применения метода.

В опубликованных российских работах, посвященных лечению язвенных дефектов при СДС с применением аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, методики получения и нанесения препарата, так же как и у зарубежных коллег, разные. Практически во всех исследованиях авторы делают заключение об эффективности данного метода в лечении язвенных дефектов при СДС. Следует отметить, что в опубликованных работах четко не обозначены критерии включения в протокол. Не везде указаны средства местного лечения в группе сравнения, а в тех случаях, где местное лечение описано - отмечено большое его разнообразие: от использования самых

простых антисептических средств до современных интерактивных перевязочных покрытий [164 - 166].

В литературе есть ряд работ, описывающих группы пациентов с язвенными дефектами стоп на фоне нарушения магистрального кровотока. В одной из них оценивается эффективность аппликаций геля, содержащего аутоплазму, обогащенную тромбоцитами, после трансметатарзальной ампутации (26 пациентов) в сравнении с контролем (32 пациента). Гель готовился по методике с использованием глубокой заморозки плазмы, без добавления активатора. Перед хирургическим вмешательством пациентам восстанавливался магистральный кровоток, при наличии признаков его снижения. На послеоперационную рану гель апплицировали 1 раз в неделю в течение месяца. В результате 96,15% ран зажило. Инфицирования и других осложнений, включая высокие ампутации, не зафиксировано. В группе контроля зажило 59,47% раневых дефектов за период наблюдения, при этом в 40,62% случаев отмечено инфицирование раны и выполнение высоких ампутаций. Авторы делают заключение об эффективности адьювантной терапией плазмой, обогащенной тромбоцитами. К особенностям данной работы можно отнести тот факт, что в исследование включались пациенты с острыми послеоперационными ранами, заживление которых отличается от течения хронических длительно незаживающих. В работе не указано, какой вид местного лечения применялся у пациентов группы контроля. Тем не менее, результаты заслуживают внимания и расширяют показания применения плазмы, обогащенной тромбоцитами не только хроническими ранами, но и острыми послеоперационными [167].

В другой работе была проведена ретроспективная оценка эффективности аппликации обогащенной плазмы у пациентов с разной степенью ишемии конечности у пациентов, наблюдающихся в одном центре. В зависимости от степени снижения магистрального кровотока пациенты были разделены на две группы: группа А с более легкими проявлениями

хронической артериальной недостаточности (I, IIa, IIb по Покровскому-Фонтейну), группа Б с тяжелыми нарушениями магистрального кровотока, включая критическую ишемию (III, IV стадии по Покровскому-Фонтейну). Отмечено уменьшение размеров раны более чем на 50% у большинства пациентов обеих групп (86% vs 56%, $p=0.23$). Сокращение раны больше чем на 90% и сохранение конечности было значимо выше в группе А (83% vs 56%, $p=0,02$ и 100% vs 73%, $p<0,001$ соответственно). Авторы делают заключение о том, что плазма, обогащенная тромбоцитами является эффективным методом адьювантной терапии даже у пациентов с язвенными дефектами на фоне снижения магистрального кровотока в нижних конечностях при невозможности его восстановить [168]. Вывод об эффективности метода сделан в одной из работ, представленной описанием нескольких клинических случаев по оценке эффективности плазмы, обогащенной тромбоцитами у пациентов с наличием язвенных дефектов после восстановления магистрального кровотока. После реваскуляризации пораженной конечности гель с плазмой наносился на рану 2 раза в неделю в течение 4 недель и 1 раз в неделю в последующие 4 недели, всего выполнялось 12 аппликаций. В среднем за 8 недель размер раны сократился на 65,3%. Авторы заключают, что данный метод не вызывает инфицирования и негативных иммунологических реакций, не требует серьезных финансовых вложений и может способствовать ускорению заживления язвенных дефектов у пациентов сахарным диабетом с критической ишемией конечности/тей после восстановления магистрального кровотока. Также в выводах авторы указывают на то, что необходимы дальнейшие работы по изучению механизма действия плазмы и стандартизации протокола ее использования. Между тем, нельзя не учесть, что в обеих работах не было пациентов контрольной группы. В этой связи, дальнейшую оценку эффективности использования аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами

целесообразно проводить с участием группы сравнения, получающей стандартную терапию.

Для приготовления геля, содержащего плазму обогащенную тромбоцитами, наряду с собственной цельной кровью, могут использоваться аллогенные тромбоциты из донорской крови. В работе по оценке эффективности аллогенных тромбоцитов количество заживших ран и скорость заживления была значимо выше в группе пациентов, получающих лечение гелем, содержащим плазму, обогащенную концентратом аллогенных тромбоцитов [79% vs 46%, $p < 0,05$ и 7.0 ± 1.9 vs 9.2 ± 2.2 (недель), $p < 0,05$]. Необходимо отметить, что в данном исследовании в группе контроля в качестве местного лечения использовался фибриноген и тромбин, что в рутинной практике не применяется. При этом, следует иметь ввиду, что наряду с рядом преимуществ, связанных с отсутствием проблем с забором аутоплазмы, есть и ограничения. Основное из них это риск инфицирования. Однако, полученные данные представляют несомненный интерес [169].

В ноябре 2018 года была опубликована работа по оценке эффективности системы LeucoPatch в лечении длительно незаживающих язвенных дефектов при СДС. Система LeucoPatch основана на получении перевязочного средства содержащего аутологичные тромбоциты, лейкоциты и фибрин. В основе метода лежит центрифугирование цельной венозной крови, но без добавления каких-либо дополнительных средств (в методиках для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами в пробирки добавляется цитрат натрия в качестве антикоагулянта). Конечный продукт представляет из себя тонкую циркулярную пластину, содержащую фибрин вместе с тромбоцитами и лейкоцитами. Наличие фибрина является основным отличительным признаком данного метода. При этом количество высвобождаемых тромбоцитами факторов роста равно или превышает таковое в других препаратах плазмы, обогащенной тромбоцитами. Данная работа была рандомизированным многоцентровым контролируемым

исследованием, проведенным в Великобритании, Дании и Швеции. Всего в исследовании приняли участие 269 пациентов. Все пациенты получали стандартную терапию, но часть из них была рандомизирована для добавления к терапии пластин LeucoPatch. Пластину накладывали 1 раз в неделю в течение 20 недель. Эффективность оценивалась по количеству заживших ран за период наблюдения в обеих группах и по скорости заживления ран. В результате в группе LeucoPatch количество заживших ран за 20 недель составила 34% по сравнению с 22% в группе только стандартного лечения ($p=0,02$), средняя скорость заживления в интервенционной группе была 72 дня (56-103), а в группе только стандартного лечения - 84 дня [(64-98), $p=0,02$] Авторы делают заключение о том, что применение системы LeucoPatch как дополнение к стандартному лечению длительно незаживающих язвенных дефектов при СДС приводит к значимому улучшению заживления этих ран [170]. При этом, следует отметить, что раны, включенные в исследование были поверхностными, в основном располагались в переднем отделе стопы, размером от 1 до 10 см² на тыле стопы., что не в полной мере отражает контингент пациентов рутинной клинической практики [171].

Тромбоцитарный фактор роста

Эффективность этого ФР доказана у пациентов с неинфицированными нейропатическими язвенными дефектами I, II по Вагнеру [172, 173]. Препарат представлен рекомбинантным ТФР, выпускается под названием «Регранекс» (OMJ Pharmaceuticals, США), назначается местно в виде 0,01% геля. Этот препарат одобрен к применению только в США. Несмотря на доказанную клиническую и экономическую целесообразность его использования, он не имеет широкого применения по ряду причин. Одна из них - это доказанный риск канцерогенеза у пациентов, которые использовали более трех тюбиков препарата. В этой связи препарат может назначаться

только если возможная польза от его применения превысит риск от побочных эффектов и с большой осторожностью у лиц с диагностированным онкозаболеванием. Еще одной возможной причиной ограниченного применения "Регранекса" является наличие современных, инновационных препаратов для местного лечения длительно незаживающих ран при СДС: биоинженерная искусственная кожа, препараты, содаржащие экстрацеллюлярные компоненты и т.д. В этой связи, интерес представляет сравнение эффективности "Регранекса" и других высокотехнологичных препаратов. До настоящего времени таких сравнительных исследований не проводилось [174].

В обзоре были рассмотрены данные об эффективности некоторых ФР в терапии язвенных дефектов у больных с СДС. В обзор не были включены данные об эффективности ФР, которые пока не подтвердили свою эффективность, например, трансформирующий фактор роста α и β (ТФР α и β), сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР), фактор роста фибробластов (ФРФ), фактор роста кератиноцитов (ФРК), инсулиноподобный фактор роста (ИФР). Практически во всех работах указывается на положительное воздействие рассмотренных ФР на течение длительно незаживающих ран при СДС. Однако, по мнению международных экспертов, опубликованного как в последней редакции международного согласительного документа по профилактике и лечению пациентов с СДС, так и в Кохрейновском обзоре, в настоящее время нет убедительных данных о преимуществах применения адьювантных методов местного лечения, включая терапию ФР. Эксперты указывают, что такой вывод сделан в силу того, что в большинстве работ есть методологические неточности, которые не позволяют сделать заключение о целесообразности их использования в местном лечении хронических длительно незаживающих язвенных дефектов при СДС [175, 176]. Для получения объективной картины с высоким уровнем доказательности необходимы дальнейшие сравнительные исследования по

изучению эффективности ФР в терапии хронических, длительно незаживающих ран при СДС с определением четких показаний и противопоказаний, оценке профиля их безопасности и разработке стандартного протокола применения.

Таким образом, в изучении СДС достигнут значительный прогресс. Обозначенные конкретные мероприятия, направленные на снижение количества высоких ампутаций, дают свои результаты. Доказано, что внедрение междисциплинарного подхода к ведению данной категории больных приводит к значимому снижению количества ампутаций нижних конечностей. Однако, многие вопросы требуют своего дальнейшего изучения. Прежде всего, необходимы когортные исследования с участием большого количества больных для анализа факторов и выявления маркеров, влияющих на заживление и его сроки в реальной клинической практике.

В настоящее время основой дифференцированного подхода к лечению больных с СДС является состояние кровотока в артериях нижних конечностей. Однако, раневые дефекты у этой группы больных, сопоставимые по состоянию магистрального кровотока, различаются по целому ряду других характеристик (длительность существования, причина возникновения, локализация и т.д.). При этом практически нет данных о морфологических особенностях ран, молекулярных механизмах нарушения репарации в них. Данные об эффективности применения дополнительных средств местной терапии противоречивы, а показания и противопоказания к их применению изучены недостаточно, что также требует своего анализа в клинической практике амбулаторного ведения пациентов с СДС. Все вышеизложенное указывает на необходимость дальнейшего изучения проблемы и возможного формирования новой парадигмы персонализированной тактики лечения данной категории пациентов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена в ГБУЗ "Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы". В исследовании приняли участие пациенты, обратившиеся за специализированной помощью в отделение диабетической стопы. Исследование носило комплексный характер и включало ретроспективную, проспективную и интервенционную части. Для каждого этапа был разработан дизайн, определены анализируемые параметры в соответствии с основной целью работы (Таблица 3).

Таблица 3. Структура работы

Этапы исследования	Объект исследования	Анализируемые параметры/конечные точки
Ретроспективный	Пациенты с СДС обратившиеся за помощью в отделение диабетической стопы с 2014 по 2019 гг.	1. Исходы лечения язвенных дефектов при СДС: Количество высоких и малых ампутаций конечности; количество заживших язвенных дефектов; сроки заживления язвенных дефектов при СДС. 2. Предикторов, влияющих на исходы лечения.
Проспективный	Пациенты с нейропатическими язвенными дефектами при СДС, соответствующие критериям включения и невключения в исследование	Морфологические признаки заживших и не заживших язвенных дефектов
Интервенционный		

<p>1.Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами в местном лечении язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы</p>	<p>Пациенты с нейропатическими язвенными дефектами при СДС, соответствующие критериям включения и невключения в исследование</p>	<p>1. Количество язвенных дефектов, заживших за 20 недель лечения; 2. Количество высоких и малых ампутаций за период исследования и наблюдения; 3. Анализ частоты побочных эффектов</p>
<p>Применение эпидермального фактора роста в комплексном лечении больных с синдромом диабетической стопы в амбулаторной практике</p>		<p>1. Доля пациентов, у которых к концу исследования отмечено формирование грануляционной ткани, покрывающей > 75% всей площади язвы. 2. Полное заживление язвенных дефектов при СДС на фоне лечения Эберпротом - П®. 3. Частота ампутаций нижних конечностей у пациентов с язвенными дефектами при СДС, получавших терапию Эберпротом - П®. 4. Частота побочных эффектов при лечении Эберпротом язвенных дефектов у больных с СДС. 5. Морфологические и иммуногистохимические параметры язвенных дефектов в периоде наблюдения</p>

СДС - синдром диабетической стопы

2.1 Материалы исследования

Материалом для анализа ретроспективной части послужила электронная база отделения диабетической стопы, составленная на основании данных амбулаторных карт пациентов. Были проанализированы амбулаторные карты пациентов, которые проходили лечение в отделении диабетической стопы с 2014 по 2019 годы с установленным диагнозом СДС.

Критерии включения в ретроспективную часть исследования:

- пациенты с диагностированным сахарным диабетом 1 или 2 типов и наличием язвенных дефектов при СДС;
- желание и способность пациента выполнять рекомендации врача.

Критерии не включения в ретроспективную часть исследования:

- пациенты, которые не посещали отделение диабетической стопы в течение 3-х и более месяцев;
- не выполнение рекомендаций врача.

Материалом для проспективной и интервенционной частей работы были пациенты с язвенными дефектами при СДС, получающие лечение в отделении диабетической стопы ГБУЗ "Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы".

Критерии включения в проспективную часть исследования:

- пациенты с диагностированным сахарным диабетом 1 или 2 типов и наличием язвенных дефектов при СДС;
- отсутствие нарушений магистрального кровотока пораженной конечности;
- отсутствие клинических признаков инфекционно- воспалительного процесса;
- желание и способность пациента выполнять рекомендации врача;
- подписанное информированное согласие.

Критерии не включения в проспективную часть исследования:

- язвенные дефекты, протекающие на фоне критической ишемии конечности;

- язвенные дефекты нижних конечностей другой этиологии, не относящиеся к синдрому диабетической стопы;
- язвенные дефекты, локализованные в пределах стоп с подозрением на злокачественное новообразование;
- язвенные дефекты при синдроме диабетической стопы с клиническими признаками инфицирования;
- нежелание пациента соблюдать рекомендации врача.

**Критерии включения в исследование по оценке эффективности
аппликаций аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами для местного
лечения язвенных дефектов при СДС:**

- пациенты с диагностированным сахарным диабетом 1 или 2 типов и наличием язвенных дефектов при СДС;
- уменьшение площади раны менее чем на 50% за 4 недели лечебных процедур;
- отсутствие признаков системного или местного инфицирования раны;
- лодыжечно-плечевой индекс на тиббиальных артериях пораженной конечности $\geq 0,9$
- уровень HbA1c $\leq 10\%$;
- подписанное информированное согласие.

**Критерии не включения в исследование по оценке эффективности
аппликаций аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами для местного
лечения язвенных дефектов при СДС:**

- язвенные дефекты расположенные выше голеностопного сустава;
- язвенные дефекты, расположенные в межпальцевых промежутках;
- клинические признаки системного или местного инфицирования : наличие двух и более признаков: локальная гипертермия, гиперемия и отек окружающих тканей, отделяемое гнойного характера, боль в области раны

пульсирующего характера, неприятный запах из раны, системное повышение температуры, лимфангит;

- лодыжечно-плечевой индекс на тибиальных артериях пораженной конечности $< 0,9$;
- критическая ишемия пораженной конечности: наличие у пациента постоянной боли, требующей регулярного обезболивания в течение 2 недель и более, наличие нарушений целостности кожных покровов в пределах стоп, связанных с одним или несколькими измененными параметрами гемодинамики: ЛПИ $< 0,4$; систолическим АД на тибиальных артериях < 50 мм.рт.ст.
- невозможность или нежелание пациента соблюдать рекомендации врача.

Критерии исключения пациента из исследования по оценке эффективности аппликаций аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами:

- желание пациента прекратить участие в исследовании;
- не соблюдение пациентами рекомендаций по разгрузке пораженной конечности и кратности посещений отделения диабетической стопы;
- появление признаков местного инфицирования язвенного дефекта;
- нежелательное явление, потребовавшее по мнению исследователя прекратить аппликации аутоплазмы.

Критерии включения пациентов в исследование по оценке эффективности внутриваневых инъекций эпидермального фактора роста для местного лечения язвенных дефектов при СДС:

- пациенты с диагностированным сахарным диабетом 1 или 2 типов;
- наличие глубокой язвы, площадью ≥ 1 см² в пределах мягких тканей при отсутствии видимых клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса и критической ишемии
- лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) ≥ 0.6 , но ≤ 1.3 или плече-пальцевой индекс (ППИ) ≥ 0.5 ;

- подписанное информированное согласие.

Критерии не включения пациентов в исследование по оценке эффективности внутрираневого инъекций эпидермального фактора роста для местного лечения язвенных дефектов при СДС:

- площадь язвы $< 1 \text{ см}^2$;
- гликированный гемоглобин HbA1c $\geq 11\%$;
- наличие рентгенологических признаков остеомиелита;
- стопа Шарко;
- показатель транскутанной оксиметрии $< 30 \text{ мм.рт.ст.}$;
- гемоглобин $< 100 \text{ г/л}$;
- злокачественное новообразование;
- инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, сердечная недостаточность, IV функциональный класс;
- хроническая почечная недостаточность;
- любое другое заболевание, способное по мнению исследователя, повлиять на участие в исследовании.

Критерии исключения пациентов из исследования внутрираневого инъекций эпидермального фактора роста:

- желание пациента прекратить проводимую терапию;
- не соблюдение пациентом рекомендаций врача;
- образование грануляционной ткани, покрывающей 100% площади язвы;
- закрытие язвенного дефекта пересаженным лоскутом;
- выходящее за границу язвенного дефекта избыточное образование грануляционной ткани;
- неудовлетворительный терапевтический результат: увеличение площади язвенного дефекта $> 25\%$ по сравнению с исходными параметрами после 4 недель терапии, либо необходимость ампутации нижней конечности;
- пропуск 10 и более инъекций исследуемого препарата;

- нежелательное явление, потребовавшее, по мнению исследователя, прекратить терапию исследуемым препаратом;
- положительный тест на беременность у женщин;
- пациент получил или нуждается в дополнительном лечении, которое могло повлиять на эффективность и безопасность исследуемого препарата.

2.1.1 Клиническая характеристика обследованных пациентов

В окончательный анализ ретроспективной части вошли данные амбулаторных карт пациентов с язвенными дефектами при СДС согласно критериям включения и не включения в исследование. Если у пациента было несколько язвенных дефектов, то с целью исключения возможного искажения результатов, в анализ включались данные по одному язвенному дефекту зафиксированному последним. (Рисунок 1)

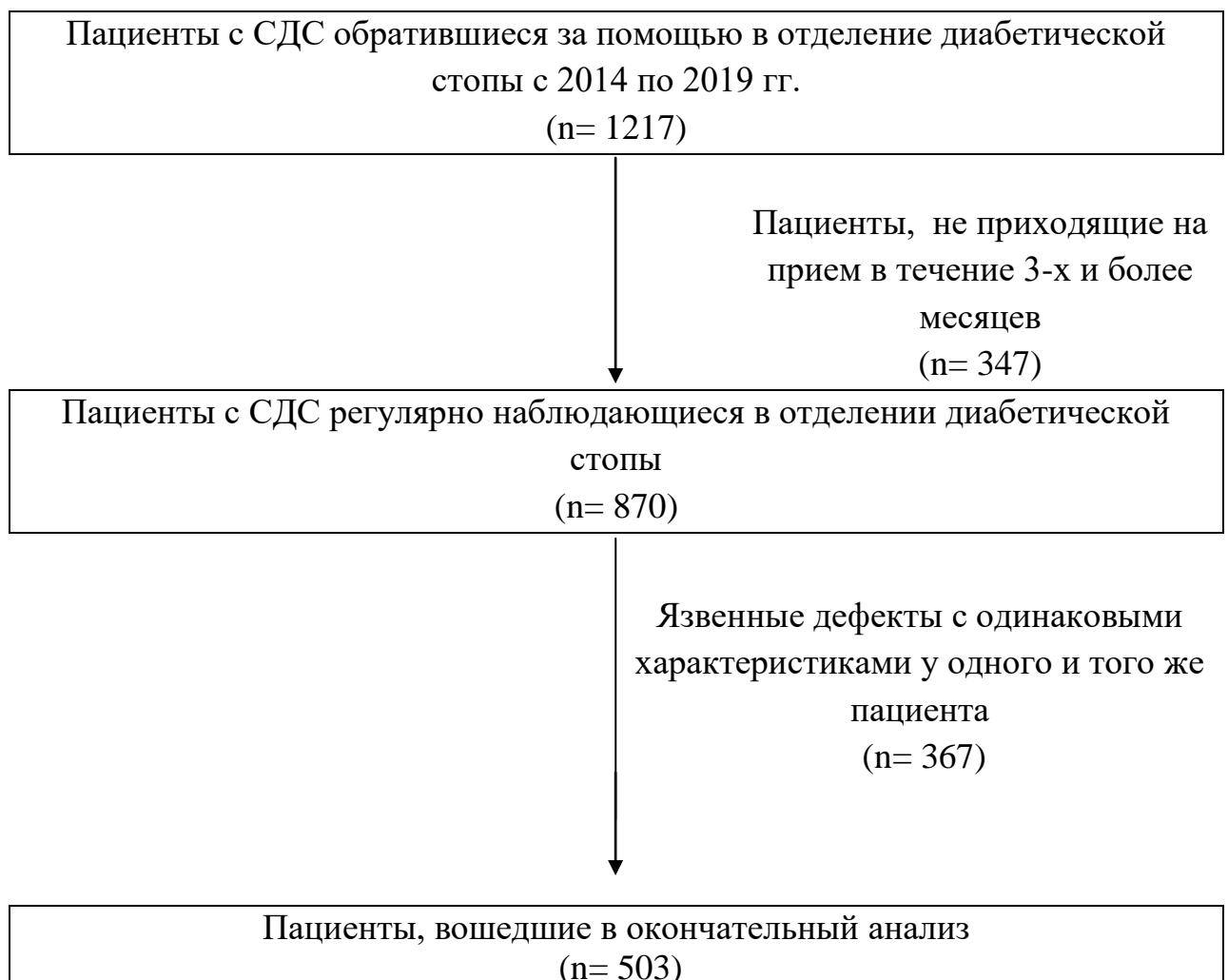


Рисунок 1. Когорта пациентов с синдромом диабетической стопы, вошедших в окончательный анализ.

Клиническая характеристика обследованных пациентов отражена в таблицах 4, 5. В большинстве случаев это были люди пожилого возраста с СД 2 типа, средним уровнем HbA1c 8%.

Таблица 4. Клиническая характеристика пациентов с синдромом диабетической стопы, проходивших лечение в отделении диабетической стопы с 2014 по 2019 годы

Параметр	Значение
Общее количество пациентов	503 (100%)
Средний возраст пациентов, годы	62,8 ± 11
Пол : М/Ж	55 /45
СД: 1/2	9,5 / 90,5
HbA1c,%	8 ± 1,62
ХБП С1-2	346 (68,9%)
ХБП С3 (а,б) - С4	141 (28,1%)
ХБП С 5	15 (3%)
Непролиферативная ДР	190 (37,8%)
Пролиферативная ДР	169 (33,6%)
Полная потеря зрения	5 (1%)

ХБП - хроническая болезнь почек; ДР- диабетическая ретинопатия. HbA1c- гликированный гемоглобин

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %) и как среднее и стандартное отклонение ((m± SD).

Таблица 5. Распределение пациентов с синдромом диабетической стопы по категориям возраста согласно классификации ВОЗ 2019 г.

Категория возраста	Количество пациентов (n, %)
Молодые (от 18 до 44 лет)	22 (4,5%)
Среднего возраста (от 45 до 60 лет)	196 (39,1%)
Пожилые (от 61 до 75 лет)	216 (43%)
Старики (старше 75 лет)	67 (13,4%)

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %)

По типу сахароснижающей терапии отмечено примерно равное соотношение пациентов, получающих пероральные сахароснижающие препараты и инсулинотерапию, с тенденцией к большему количеству пациентов, которым назначалась инсулинотерапия (Таблица 6).

Таблица 6. Распределение пациентов с синдромом диабетической стопы по виду сахароснижающей терапии

Сахароснижающая терапия	Количество пациентов (n, %)
Пероральные сахароснижающие средства	202 (40,1%)
Инсулинотерапия	238 (47,3 %)
Комбинированная терапия	63 (12,6%)

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %)

При стратификации пациентов по уровню HbA1c было выявлено, что пациентов с уровнем HbA1c $\leq 7,5\%$ и от 7,5 до 10% примерно равное количество, с незначительным преобладанием тех, у кого уровень HbA1c находится в пределах от 7,6 до 10%. Пациенты с неудовлетворительным контролем заболевания (HbA1c $>10\%$) составили 11,3% от общего количества (Таблица 7).

Таблица 7. Распределение пациентов с синдромом диабетической стопы по уровню HbA1c

Значения HbA1c	Количество пациентов (n, %)
$\leq 7,5 \%$	205 (40,8%)
$>7,6 \% \leq 10 \%$	242 (48%)
$>10 \%$	56 (11,2%)

HbA1c- гликированный гемоглобин. Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Согласно российским и международным рекомендациям по терапевтическим целям показателей контроля углеводного обмена при СД 1 и 2 типов, одной из категорий выбора индивидуальных целей лечения является возраст пациентов. При распределении пациентов с СДС по уровню HbA1c в зависимости от возрастных категорий были получены сопоставимые значения HbA1c (Таблица 7; Рисунок 2).

Таблица 8. Распределение пациентов с синдромом диабетической стопы по уровню HbA1c в зависимости от возрастных категорий

Возрастная категория	Значения HbA1c (%)
18-44 (лет)	8,3±1,95
45-60 (лет)	8,39±1,71
61-75 (лет)	8,11±1,79
> 75 лет	7,92±1,38

HbA1c- гликированный гемоглобин. Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

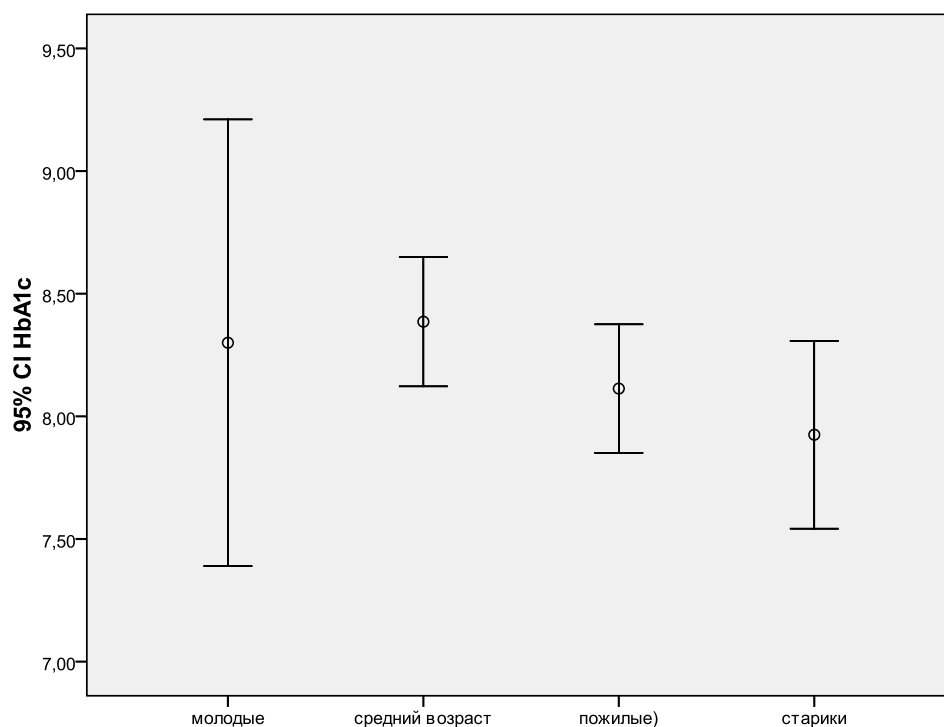


Рисунок 2. Распределение пациентов с язвенными дефектами при синдроме диабетической стопы по уровню HbA1c в зависимости от возрастных категорий

2.1.2. Клиническая характеристика язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы обследованных пациентов

В таблице 9 приведены основные параметры, характеризующие язвенные дефекты при СДС у обследованной когорты пациентов.

Таблица 9. Характеристика язвенных дефектов пациентов с синдромом диабетической стопы.

Параметр	Значение
Общее количество язвенных дефектов	503(100%)
Количество нейропатических язвенных дефектов (n,%)	336 (66,8%)
Количество нейро-ишемических язвенных дефектов (n,%)	167 (33,2%)

Количество язвенных дефектов с различной длительностью существования до обращения (дни)	
≤ 30	242 (48,1 %)
31- 90	127 (25,2 %)
91-180	55 (10,9 %)
181-365	40 (8%)
> 365	39 (7,8 %)
Причина возникновения язвенного дефекта	
Послеоперационная рана (вскрытие флегмоны, ампутации в пределах стопы)	81 (15,9 %)
Любая травма (механическая, химическая, термальная)	422 (84,1%)
Плантарная локализация язвенного дефекта	397 (79 %)
Количество больных с глубиной язвенного дефекта по классификации Вагнер	
I ст.	24 (4,8%)
II ст.	377 (74,9%)
III ст. (остеомиелит)	97 (19,3 %)
IV ст. (гангрена)	5 (1,0 %)
Количество пациентов с площадью язвенного дефекта	
$< 1 \text{ см}^2$	439 (87,2 %)
$1-5 \text{ см}^2$	40 (8,3 %)
$> 5 \text{ см}^2$	24 (4,5 %)
Количество больных с инфицированием язвенного дефекта при первичном обращении	173 (34,4 %)

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Согласно данным, представленным в таблице, практически в половине всех случаев пациенты обращались за специализированной помощью в течение 30 дней с момента возникновения раны. Однако, были и больные с язвенными дефектами, существовавшими более 1 года (7,8%). В исследуемой группе большинство повреждений (79,7%) было в пределах кожи и подкожной клетчатки (I-II ст. по классификации Вагнер), не превышало 1 см² (87,2%), располагалось на подошвенной поверхности (79%). При первичном обращении более трети ран было инфицировано, что потребовало назначения системных антимикробных препаратов. Следует обратить внимание на тот факт, что у большинства пациентов язвенные дефекты возникали на фоне адекватного магистрального кровотока нижних конечностей, что изначально означает благоприятный исход течения раны. Распределение соотношения нейропатических и нейро-ишемических язвенных дефектов в зависимости от возрастной категории отражено в таблице 10. С возрастом соотношение нейропатических и нейроишемических язвенных дефектов меняется. Если в группе молодых пациентов оно составляет 95 % к 5%, то в возрастной группе старше 75 лет становится 44% к 56%. Однако, следует обратить внимание, что даже в этой самой старшей группе процент пациентов с адекватным магистральным кровотоком достаточно высок.

Таблица 10. Распределение язвенных дефектов при нейропатической и нейро-ишемической формах синдрома диабетической стопы в различных возрастных категориях.

Возраст	Форма СДС	
	Нейропатическая (n=336)	Нейроишемическая (n=167)
18- 44 года	20 (6,1%)	2 (1,3%)
45-60 лет	150 (44,9%)	40 (23,7%)
61-75 лет	135 (40,4%)	80 (47,9%)
> 75 лет	31 (8,6%)	45 (27,1%)

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Как указывалось выше, анализировались данные пациентов, которые регулярно обращались в отделение диабетической стопы и соблюдали предписанный режим, что не отражает ситуации в генеральной совокупности. В этой связи были проанализированы параметры пациентов включенных и не включенных в работу. В таблице 11 приведены данные сравнительных клинических характеристик пациентов, наблюдающихся в отделении диабетической стопы с известным исходом течения язвенного дефекта и не посещавших отделение, в связи с чем исход язвенных дефектов остался не известен.

Таблица 11. Сравнительная характеристика пациентов включенных и невключенных в анализ.

Параметр	Включенные в анализ n=503	Не включенные в анализ n= 347	p
Возраст, годы	62,5 ±10,8	63,5 ±11,6	0,17
Пол			
Мужчины	271 (54%)	194 (56%)	0,35
женщины	232 (46%)	149 (44%)	
Тип СД			
СД 1 типа	54 (10,7%)	30 (8,6%)	0,49
СД 2 типа	449 (89,3%)	317 (91,4%)	
HbA1c,%	8,1 ±1,7	8,1 ±1,5	0,95
Форма СДС			
Нейропатическая	336 (67%)	212 (61%)	0,03
Нейро-ишемическая	167 (33%)	135 (39%)	
Обращение за специализированной			

помощью			
До месяца	287 (57%)	128 (37%)	0,001
До 3-х месяцев	106 (21%)	90 (26%)	
До 6 месяцев	45 (9%)	59 (17%)	
До года	35 (7%)	39 (11%)	
Больше года	30 (6%)	31 (9%)	
Локализация			
Плантарная	382 (76%)	267 (77%)	0,83
Не плантарная	121 (24%)	80 (23%)	
Инфицирование при первичном обращении	186 (37%)	80 (23%)	0,001
Размер			
< 1 см ²	448 (89%)	323 (93%)	0,51
1-5 см ²	45 (9%)	19 (5,4%)	
> 5 см ²	10 (2%)	5 (1,6%)	

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %) и как среднее и стандартное отклонение ($m \pm SD$).

Пациенты, посещавшие отделение диабетической стопы и не наблюдавшиеся регулярно были сопоставимы по таким параметрам как возраст, пол, тип СД, уровень компенсации углеводного обмена, размер и локализация язвенного дефекта. У не включенных в дальнейший анализ пациентов отмечено большее количество язвенных дефектов на фоне снижения кровотока. Они обращались за специализированной помощью позже, при этом инфицирования при первичном обращении наблюдались реже.

2.2. Методы исследования

Всем пациентам при первичном обращении проводилась оценка состояния магистрального кровотока и периферической чувствительности.

2.2.1. Оценка состояния периферической чувствительности.

Состояние периферической чувствительности оценивалось по результатам определения тактильной, болевой, вибрационной чувствительностей, коленного и ахиллова рефлексов согласно рекомендациям международного консенсуса по диабетической стопе [1].

Для оценки состояния тактильной чувствительности применялась стандартная методика с использованием монофиламента массой 10 г (5.07 Semmes-Weinstein, North Coast Medical, Inc., USA). Исследование проводилось в положении пациента лежа на спине, в спокойном расслабленном состоянии. На подошвенной поверхности стоп в определенных точках (подошвенная поверхность 1 пальца, проекции 1 и 5 плюснефаланговых сочленений) исследователь (врач или медицинская сестра) прикасался монофиламентом. В исследуемых точках не должно быть участков гиперкератоза, нарушений целостности кожных покровов. Монофиламент необходимо располагать перпендикулярно поверхности кожи, при прикосновении он должен прогнуться. Тактильная чувствительность считалась ненарушенной, если пациент ощущал 2 из 3 прикосновений. Тактильная чувствительность считалась нарушенной, если пациент не ощущал 2 прикосновения [Рисунки 3 (а,б); 4].



а



б

Рисунок 3 (а,б) . Правильное использование монофиламента (объяснение в тексте)

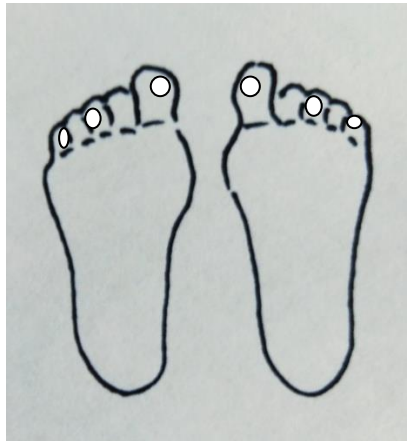


Рисунок 4. Места на подошвенной поверхности стоп, рекомендуемые для проведения исследования тактильной чувствительности монофиламентом

Болевая чувствительность исследовалась при помощи иглы с притупленным концом неврологического молоточка. Исследование проводилось на тыльной поверхности 1 пальца, в положении пациента лежа на спине с закрытыми глазами (Рисунок 5). Болевая чувствительность считалась ненарушенной, если пациент чувствовал боль от укола. Болевая чувствительность считалась нарушенной, если пациент не чувствовал боли от укола острым предметом.



Рисунок 5. Оценка болевой чувствительности при помощи «тупой» иглы.

Температурная чувствительность оценивалась при помощи резиновой и металлической частей неврологического молоточка. Исследование проводилось на тыльной поверхности 1 пальца в положении пациента лежа на спине с закрытыми глазами (Рисунок 6). Температурная чувствительность считалась ненарушенной, если пациент ощущал разницу температур в исследуемых точка. Температурная чувствительность считалась нарушенной, если пациент не ощущал разницу температур в исследуемых точках.



Рисунок 6. Оценка температурной чувствительности при помощи специального прибора тип-терм (Thip-term).

Вибрационная чувствительность оценивалась при помощи биотезиометра (Bio Medical Instrument Co, Newbury, Ohio, USA; Рисунок 7). Исследование проводилось на костном выступе 1 плюснефалангового сочленения в положении пациента лежа на спине. Предварительно прибор устанавливался на дистальный выступ лучевой кости для того, чтобы

пациент мог понять как вибрирует прибор. При проведении теста, первоначально вибрация прибора доводилась до максимальных величин (50 Вольт), при повторном измерении, пациента просили сказать, когда он начинал чувствовать вибрацию прибора. Вибрационная чувствительность считалась значительно нарушенной, если первые признаки вибрации пациент начинал ощущать при показаниях биотезиометра ≥ 25 Вольт.



Рисунок 7. Оценка вибрационной чувствительности при помощи биотезиометра.

Коленные рефлексы оценивались при помощи неврологического молоточка в положении пациента лежа на спине с полусогнутыми в коленных суставах нижними конечностями. Неврологическим молоточком наносился удар по надколенной связке каждой из конечностей. При адекватном сокращении четырехглавой мышцы бедра коленный рефлекс считался не нарушенным. Коленный рефлекс считался отсутствующим, если не происходило сокращения четырехглавой мышцы бедра. Ахилловы рефлексы оценивались при помощи неврологического молоточка в положении пациента лежа на спине. При проведении теста конечности сгибались поочередно в коленном суставе с опорой стопы на левую руку исследователя. Правой рукой наносился удар неврологического молоточка по ахилловому сухожилию правой или левой конечности. Ахиллов рефлекс считался ненарушенным, если происходило адекватное разгибание стопы.

Ахиллов рефлекс считался отсутствующим, если при проведении теста стопа не разгибалась.

Для определения степени тяжести периферической полинейропатии проводилась количественная лоценка имеющихся расстройств в соответствии с шкалой Нейропатического Дисфункционального Счета (НДС). Для расчета по шкале НДС каждому виду чувствительности присваивался определенный балл в зависимости от выявленного уровня нарушения (Таблица 12).

Таблица 12. Нейропатический дисфункциональный счет [177]

Чувствительность/ локализация	тактильная	болевая	температурная	Рефлексы : коленный/ахиллов (0- норма, 1-ослабление, 2- отсутствие)
справа				/
слева				/
Сумма НДС (Сумма рефлексов + Сумма всех видов чувствительности/2)				

0- норма, 1- отсутствие в пальцах стоп, 2 – отсутствие до уровня середины стопы, 3- отсутствие до уровня лодыжек, 4- отсутствие до уровня середины голеней, 5- отсутствие до уровня колен

Значения шкалы НДС от 0 до 4 баллов свидетельствовали об отсутствии либо наличии у пациента начальных признаков ДПН, от 5 до 13 баллов соответствовали умеренно выраженной нейропатии, НДС \geq 14 баллов означали наличие выраженной ДПН [177]

2.2.2. Оценка состояния магистрального кровотока нижних конечностей

Нарушение магистрального кровотока диагностировалось на основании оценки пульсации на передней и задней тиббиальных артериях путем их пальпации и ультразвуковой доплерографии с вычислением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ). Кровоснабжение в нижних конечностях считалось нарушенным, если пульсация хотя бы на одной из артерий отсутствовала или

была ослабленной. ЛПИ вычислялся следующим образом: с помощью сфигмоманометра и доплеровского датчика (Smartdop 30EX, Hadeco, Inc, Япония) измеряется давление в плечевой артерии, а затем в тиббиальных: передней и задней. ЛПИ вычисляется как отношение среднего артериального давления в тиббиальных артериях к артериальному давлению в плечевой артерии. В норме ЛПИ располагается в диапазоне от 0,9 до 1,2. При показателе ЛПИ < 0,9 для уточнения диагноза выполнялись: 1. дуплексное сканирование артерий нижних конечностей; 2. транскутанная оксиметрия на пораженной конечности (TcPO₂). Ишемия конечности считалась критической (КИ) при наличии у пациента постоянной боли, требующей регулярного обезболивания в течение 2 недель и более, нарушений целостности кожных покровов в пределах стопы, связанных с одним или несколькими измененными параметрами гемодинамики: ЛПИ < 0,4; систолическим АД на тиббиальных артериях < 50 мм.рт.ст. [29].

2.2.3. Диагностика синдрома диабетической стопы

Синдром диабетической стопы (СДС) диагностировался согласно определению, данному в Международном согласительном документе по диабетической стопе при наличии инфекции, язвы или деструкции глубоких тканей стопы на фоне нейропатии и/или нарушения кровотока в артериях нижних конечностей [1, 29]. Форма синдрома определялась на основании оценки состояния периферической чувствительности и магистрального кровотока. При наличии признаков нарушения периферической чувствительности и отсутствии признаков нарушения магистрального кровотока диагностировалась нейропатическая форма СДС, при наличии признаков нарушения периферической чувствительности и признаков нарушения магистрального кровотока диагностировалась нейро-

ишемическая форма СДС. Язвенные дефекты на фоне КИ в исследование не включались.

При наличии поражения костей, суставов, мягких тканей стопы и голеностопного сустава неинфекционной природы на фоне нейропатии с признаками воспаления в острой фазе диагностировалась диабетическая нейроостеоартропатия (стопа Шарко). [1, 29].

2.2.4. Характеристика язвенных дефектов

Глубина распространения язвенного дефекта оценивалась по классификации Вагнера (Wagner). В зависимости от глубины поражения язвенному дефекту присваивалась степень от 0 до 5:

0 степень- интактная неповрежденная кожа;

1 степень – поверхностная язва: процесс захватывает эпидермис и дерму;

2 степень - процесс захватывает кожу, подкожную клетчатку, мягкие ткани;

3 степень – глубокая язва, абсцесс, остеомиелит, септический артрит;

4 степень- некроз всех слоев кожи отдельных участков стопы (например, часть пальца/палец);

5 степень- некроз всех слоев кожи части стопы/всей стопы [178].

Оценка размера раны производилась путем измерения линейных размеров: длины и ширины (см) и вычисления площади умножением длины на ширину (см²).

Инфицирование раны диагностировалось на основании наличия двух и более признаков при первичном обращении пациента: локальная гипертермия, гиперемия и отек окружающих тканей, отделяемое гнойного характера, боль в области раны пульсирующего характера, неприятный запах из раны, системное повышение температуры, лимфангит [179, 180]

2.2.5. Диагностика осложнений сахарного диабета

Наличие и степень тяжести осложнений сахарного диабета (диабетическая ретинопатия (ДР) и диабетическая нефропатия (ДН)) оценивались на основании заключений специалистов (окулиста, нефролога) в амбулаторных картах пациентов, данных лабораторных анализов крови (креатинин, скорость клубочковой фильтрации (СКФ), соотношение альбумина/креатинина в моче) [6].

В качестве возможных факторов, влияющих на исход, рассматривались следующие показатели:

1. Демографические данные (пол, возраст).
2. Параметры, относящиеся к основному заболеванию:
 - 2.1 Степень контроля СД (уровень HbA1c).
 - 2.2 Наличие пролиферативной стадии диабетической ретинопатии (ДПР).
 - 2.3 Наличие терминальной стадии диабетической нефропатии (ДН).
3. Параметры, относящиеся к язвенному дефекту.
 - 3.1 Длительность существования раны. Данный показатель вычислялся на основании анамнестических данных о дате возникновения раны со слов пациента и дате первичного визита с имеющимся язвенным дефектом в отделение диабетической стопы. По длительности существования язвенные дефекты были разделены на следующие группы: 30 дней, 31- 90 дней, 91-180 дней, 181-365 дней, > 365 дней.
 - 3.3. Форма СДС: нейропатическая или нейроишемическая (в отсутствии критической ишемии).
 - 3.4. Расположение язвенного дефекта: плантарно или не плантарно (тыл стопы или пальцев стопы, межпальцевые промежутки и т.д.).
 - 3.5. Размер раны. Площадь язвенных дефектов была ранжирована следующим образом: <1 см², 1- 5 см², > 5 см².

3.6. Глубина раны определялась в соответствии с классификацией Вагнера.

3.7. Инфицирование раны .

2.2.6 Морфологические методы исследования

Биопсийный материал забирался из краев и из центра раны после промывания ее физиологическим раствором и очищения от видимых некротических масс. Местная анестезия места взятия материала не требовалась в силу наличия выраженной диабетической полинейропатии и отсутствия болевой чувствительности. Скальпелем срезался верхний слой раны в объеме до 0,5 см³, фиксировался в 10% нейтральном растворе формалина и заливался в парафин. Общее время фиксации и заливки не превышало 48 часов. Затем были приготовлены серийные парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы фиксировали на покрытых поли-L-лизином предметных стеклах и инкубировали при 37 °С в течение 12 часов. Затем срезы были депарафинизированы и промыты следующим образом: три раза ксилолом, два раза абсолютным этанолом, два раза 95% этанолом, 80% этанолом, 70% этанолом и дистиллированной водой. Серийные парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Морфометрическая оценка состояла из определения относительной площади некроза, грануляций и фиброза (в %).

Количество гиалинизированных сосудов выражалось в баллах (от 0 до 3) Балл «0» ставился в том случае, если в биоптате отсутствовали гиалинизированные сосуды, «1» - при наличии менее 10% гиалинизированных сосудов, «2» - при наличии от 10 до 40% гиалинизированных сосудов, «3» - при наличии $\geq 40\%$ гиалинизированных сосудов.

Иммуногистохимический анализ. В качестве маркеров пролиферации были выбраны ядерный белок Ki 67, гладкомышечный актин (SMA) и цитокератин (СК). Ki67 экспрессируется в большинстве фаз митотического цикла и является универсальным маркером пролиферативной активности клеток. Определение его содержания используется в различных областях медицины, включая онкологию. В случае хронизации раневого процесса по его уровню можно оценить регенеративный потенциал тканей раны. SMA – это белок, который экспрессируется гладкомышечными клетками и миофибробластами. В свою очередь миофибробласты являются одними из ключевых клеток пролиферативной фазы. То есть, SMA может служить маркером наличия миофибробластов, непосредственно участвующих в заключительной стадии заживления. Эпителизация завершает заживление раны, что может быть оценено по экспрессии цитокератинов. Цитокератины представляют собой структурные белки, входящие в состав промежуточных микрофиламентов цитоскелета, характерных для клеток эпителиальной ткани.

Ангиогенез оценивался по уровню экспрессии мембранного белка CD 34, который является маркером предшественников эндотелиальных клеток и самих эндотелиальных клеток кровеносных сосудов [181, 182].

Наличие клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток определялись по экспрессии фермента альдегиддегидрогеназы 1 типа (ALDH1). ALDH1 относится к детоксифицирующим ферментам, играет роль в ранней дифференцировке стволовых клеток, отвечая за окисление ретинола в ретиноевую кислоту [183].

Также анализировалось содержание в ране следующих факторов роста и рецепторов к ним: сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР, СЭФР_p), инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1, ИФР1_p), эпидермальный фактор роста (ЭФР, ЭФР₁).

Иммуногистохимические реакции ставились по общепринятой методике с демаскировкой антигенов в ретривере на серийных парафиновых срезах биоптата раны. Блокирование эндогенной пероксидазы проводилось 3% пероксидом водорода в депарафиновых срезах.

Неспецифическое связывание IgGs блокировали с помощью обычной козьей сыворотки 1: 50 в 0,1% бычьим сывороточном альбумине (BSA; без глобулинов) в фосфатном буфере с pH 7,4, помещенных в увлажненную камеру при комнатной температуре на 30 мин. Затем срезы инкубировали с первичными специфическими антителами к Ki 67 (Dako, Дания, 1:100), SMA (Springbioscience, США, 1:100), цитокератину (Dako, Denmark, 1:100), СЭФР (моноклональные мышинные anti-human антитела VG1, Dako, Дания), рецепторам к СЭФР (СЭФР_p, поликлональные кроличьи антитела, Abcam, США), инсулиноподобному фактору 1 (ИФР1, поликлональные кроличьи антитела, Abcam, США), рецепторам к ИФР1 (ИФР1_p, моноклональные мышинные anti-human антитела JWB902, LifeSpan BioSciences, США), эпидермальному фактору роста (ЭФР, кроличьи поликлональные антитела, Abcam, США), рецепторам к ЭФР (ЭФР_p, моноклональные мышинные anti-human антитела H11, Dako, Дания), ALDH1, CD34 (моноклональные мышинные anti-human антитела H11, Dako, Дания). Далее образцы инкубировали со вторичным биотинилированным козьим анти-кроличьим антителом в течение получаса при комнатной температуре и трижды промывали в фосфатном буфере. После 30-минутной инкубации с пероксидазой АВС и последующей промывкой ТТБ субстрат, 0,05% тетрагидрохлорид 3,3-диаминобензидина в Трис-буфере добавляли до достаточного развития цвета, и все это делалось в течение одного и того же периода времени для прямого сравнения. Это приводит к тому, что иммунопозитивные клетки маркируются коричневым цветом. Затем срезы промывали в двойной дистиллированной воде, окрашивали гематоксилином

Майера и устанавливали на практическую установку. Контрольные образцы инкубировали в течение ночи только с RBS вместо первичных антител.

Оценка результатов. Результаты иммуногистохимических реакций оценивались в процентах по количеству клеток с позитивным окрашиванием. За 100% принимались 300 клеток одного вида.

Уровень ангиогенеза рассчитывали по среднему количеству CD34-положительных новообразованных сосудов в 10 полях зрения при увеличении x 400.

Интенсивность окрашивания (иммуностейнинга), наблюдавшегося на слайдах, оценивалась двумя независимыми наблюдателями как отсутствующая "-", умеренная "+" (до 20% окрашенных клеток), умеренная "++" (от 21 до 40% окрашенных клеток) и сильная "+++" (41% и более окрашенных клеток) по сравнению с отрицательным контролем. Для статистической обработки результаты были выражены в цифрах (баллы 0-6; Таблица 13).

Таблица 13. Оценка интенсивности окрашивания экспрессии маркеров в образцах при иммуногистохимическом анализе

Балл	Интенсивность окрашивания образцов
0	-
2	+
4	++
6	+++

Фотографирование. Фотосъемка образцов проводилась на микроскопе Olympus VX 46 с цифровой камерой с увеличением 10x1000.

Морфологические методы исследования были выполнены на кафедре патологической анатомии имени академика А.И. Струкова в ГБОУ ВПО «Первый Московский Медицинский Государственный Университет им. И.М. Сеченова» под руководством д.м.н., профессора Коган Е.А. (с 2022 г. Институт клинической морфологии и цифровой патологии Института клинической медицины им.Н.В.Склифосовского ФГАУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова, директор- д.м.н., профессор Демура Т.А.).

2.2.7 Методы консервативной терапии язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы.

Все пациенты получали лечение в соответствии с международными стандартами оказания медицинской помощи при СДС [6, 184]. В случае наличия нейропатических язвенных дефектов ведение пациентов базировалось на следующих принципах: разгрузка пораженной конечности, антибактериальная терапия (при необходимости), местное ведение ран с использованием современных перевязочных средств и учетом стадии течения раны.

Режим разгрузки обеспечивался в нескольких вариантах: 1) обувь с разгрузкой переднего или заднего отделов стопы; 2) жесткий иммобилизирующий ортез с фиксацией голеностопного сустава; 3) индивидуальная разгружающая повязка (ИРП) в съёмном или несъёмном вариантах. ИРП накладывалась непосредственно на приеме.

Антибактериальная терапия назначалась при наличии местных или системных признаках инфицирования раны. Первоначальный выбор препарата проводился эмпирически на основании клинических и эпидемиологических данных о преобладающих возбудителях, степени тяжести инфекционного процесса, наличия и степени выраженности

нефропатии, нейропатии, аллергических реакций, предшествующих госпитализаций. Предпочтения отдавались антибактериальным средствам широкого спектра действия: защищенным пенициллинам (Амоксициллин/клавуланат, Амоксициллин/сульбактам, Ампициллин/сульбактам), фторхинолонам (Левифлоксацин, Ципрофлоксацин) в таблетированном режиме приема. При отсутствии эффекта терапия корректировалась с учетом результатов бактериологического исследования.

Местное лечение ран состояло из очищения, промывания, применения перевязочного средства. Очищение раны заключалось в удалении некротизированных тканей, окружающего гиперкератоза. Объем вмешательства определялся состоянием раневого дефекта: некротизированные ткани удалялись скальпелем, ложкой Фолькмана за один прием или путем поэтапной обработки. С целью удаления инородных частиц, поверхностных нежизнеспособных наслоений, остатков предыдущих раневых покрытий рана промывалась раствором антисептика (0,05% Хлоргексидин), либо физиологическим раствором. На завершающем этапе на рану накладывалось перевязочное средство. Выбор перевязочного средства основывался на стадии раневого процесса и уровне экссудации. Применялись многокомпонентные мази на водорастворимой основе, альгинатные перевязочные средства, гидрволокна.

Все больные с язвенными дефектами на фоне снижения/или отсутствия магистрального кровотока в пораженной конечности были проконсультированы сосудистым хирургом, который определял объем дообследования и необходимость госпитализации в отделение сосудистой хирургии. В рамках подготовки к госпитализации пациенты получали стандартную терапию язвенных дефектов с учетом имеющегося нарушения кровотока. Следует отметить, что в качестве местного лечения применялись только растворы жидких антисептиков. В качестве разгрузки использовался,

в основном, обувь с разгрузкой переднего или заднего отделов стопы, в ряде случаев ортез.

Кратность визитов в клинику в среднем составляла 1 раз в 7 дней. При необходимости частота посещений увеличивалась до 1 раза в 3 дня.

Рана считалась зажившей, если она была полностью эпителизирована в результате проведенных лечебных мероприятий и не рецидивировала в течение 4-х недель. Рана считалась длительно незаживающей, если она не изменялась в размерах или эти изменения были незначительны в течение года при соблюдении стандартов оказания специализированной помощи.

2.2.8. Методы статистической обработки данных.

Данные описательной статистики представлены как средние со стандартным отклонением ($M \pm SD$) в случае нормального распределения данных, как медиана и значения 25-го и 75-го перцентилей множества данных [Me (25; 75)] при отличном от нормального распределения данных. При частотном распределении переменных по категориям как абсолютное число и его процентное выражение (n, %). При наличии пропущенных данных в анализируемой базе в таблице указывался действительный процент.

Сравнение двух групп проводилось при помощи таблиц сопряженности с вычислением критерия χ^2 при номинальных переменных и сравнения средних значений с вычислением t-критерия Стьюдента при непрерывных переменных с нормальным распределением данных. В случае неравномерного распределения данных для сравнения двух независимых выборок применялся метод Манна-Уитни с вычислением U-критерия.

Для сравнения нескольких независимых выборок при нормальном распределении данных применялся однофакторный дисперсионный анализ

ANOVA. Для того, чтобы определить между какими из исследуемого множества групп выявляются статистически значимые различия выполнялось попарное сравнение данных методом Тьюки. При неравномерном распределении данных для сравнения нескольких независимых выборок применялся дисперсионный анализ Краскала — Уоллеса с вычислением H-критерия. В такой ситуации попарное сравнение данных не выполнялось.

Разница считалась значимой при уровне $p < 0.05$.

Построение модели предсказания наступления события (например, выполнения высокой ампутации или заживления хронического язвенного дефекта) выполнялось в два этапа. На первом этапе для выявления ассоциативных связей каждого из потенциальных предикторов исхода вычислялось отношение шансов наступления и ненаступления события. На втором этапе с учетом того, что в реальной клинической практике на исход влияют не отдельно взятые параметры, а их совокупность, для построения многомерной модели одновременного воздействия множества независимых факторов были применены методы: 1) логистической регрессии, где в качестве зависимой переменной выступал исход течения язвенного дефекта: заживление или ампутация на любом уровне; 2) метод «дерева решений». Данный метод позволяет построить модель, учитывающую влияние различных параметров на конкретное событие и выбрать фактор или факторы, которые значимо влияют на вероятность его наступления, кроме того, данный метод обладает большей наглядности и позволяет визуализировать полученные результаты.

Для выявления факторов, потенциально способных оказывать достоверное влияние на сроки наступления события (например, заживления язвенных дефектов) был использован метод регрессии Кокса. При этом, в данной модели в качестве «объекта» выступала вся когорта больных с СДС, проходивших лечение в исследуемый период времени. В качестве «события»

рассматривалось заживление язвенного дефекта. В качестве «времени»: 1) в случае заживления - время от первичного обращения в клинику (начало лечения) до полной эпителизации раны; 2) если заживление не наступило в исследуемый период – время от начала лечения до окончания исследования; 3) если заживление наступило после хирургического вмешательства – время от начала лечения до даты выполнения вмешательства; 4) если связь с пациентом была утрачена – время от начала лечения до даты последнего визита в клинику.

Для выявления возможного значимого взаимного влияния параметров выполнялся корреляционный анализ. Применялись коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена. При выявлении между переменными коэффициента корреляции ≥ 0.5 одновременное использование этих переменных в регрессии Кокса не проводилось.

Статистический анализ проводился с использованием программы SPSS, версия 17.0.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Анализ амбулаторного лечения больных с синдромом диабетической стопы

На первом этапе работы основной целью был анализ исходов лечения язвенных дефектов у пациентов с синдромом диабетической стопы и выявление предикторов, влияющих на него. Оценивались следующие варианты исходов: заживление язвенного дефекта, ампутация конечности, продолжение лечения на момент окончания периода исследования, смерть. Заживление определялось как полная эпителизация (отсутствие нарушений целостности кожных покровов) язвенного дефекта и отсутствие рецидива в течение 4-х недель наблюдения. В эту группу вошли пациенты, у которых заживление язвенных дефектов наступило в результате консервативных лечебных мероприятий, а также после хирургического вмешательства, но без удаления пальцев или части стопы. При выполнении ампутации нижней конечности учитывался ее уровень. К высоким ампутациям относятся ампутации выше голеностопного сустава: на уровне голени или бедра. Ампутации пальцев стоп или части стопы, выполняемые до уровня голеностопного сустава относятся к малым. На втором этапе исследования анализировались сроки заживления язвенных дефектов, факторы, влияющие на сроки заживления .

3.1.1. Анализ исходов лечения язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы

В течение исследуемого периода заживление без выполнения высоких и малых ампутаций в общей когорте пациентов с СДС отмечено в 407 случаях (80,9 %). В 32 (6,3%) случаях потребовалось выполнение ампутаций,

из них: 23 (4,6) в пределах стопы, 3 на уровне голени (0,6%), 6 на уровне бедра (1,2%). Смерть наступила у 6 пациентов (1,2%), из них у 2 после выполнения ампутации на уровне бедра. 61 пациент (12,1%) продолжал лечиться на момент окончания исследования (Рисунок 8).

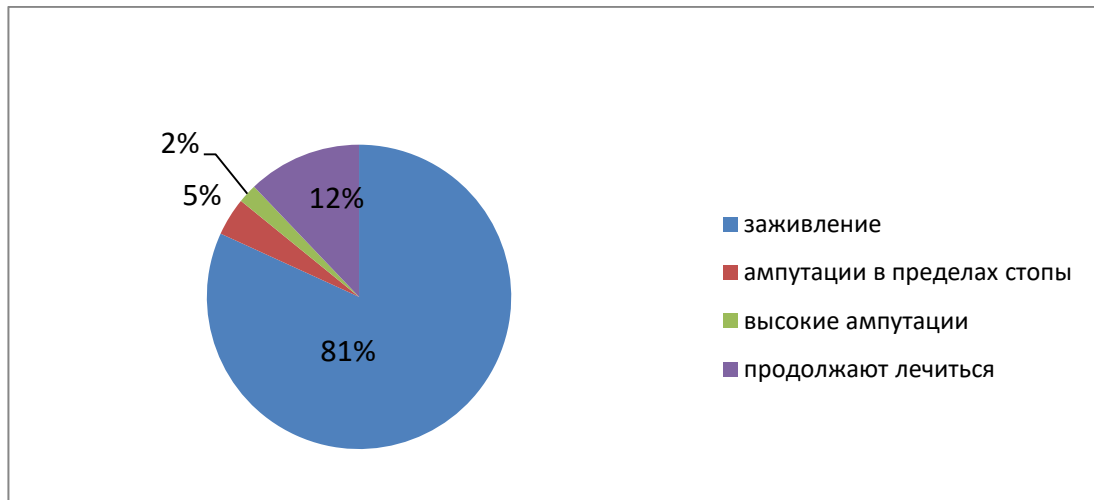


Рисунок 8. Исходы лечения язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы в когорте пациентов, наблюдающихся в отделении диабетической стопы с 2014 по 2019 гг.

Таким образом, в подавляющем большинстве случаев удалось достичь заживления язвенных дефектов при СДС в результате проведения консервативных терапевтических мероприятий без выполнения ампутаций на любом уровне.

Учитывая различия в патогенезе и прогнозе нейропатической и нейроишемической форм СДС была проведена стратификация когорты по наличию или отсутствию ишемии пораженной конечности. Клиническая характеристика пациентов отражена в таблице 14.

Таблица 14. Клиническая характеристика пациентов с нейропатической и нейро-ишемической формами синдрома диабетической стопы.

Параметр	Нейропатическая форма СДС (n= 336)	Нейро-ишемическая форма СДС (n= 167)	p
Средний возраст пациентов, годы	60,17 ± 11,2	67,18 ± 9,43	0,0001
Пол (М/Ж, %)	58 /42	59 /41	0,92
СД 1/2 (%)	11 /89	8 /92	0,4
HbA1c (%)	8,19 ± 1,68	8,23 ± 1,79	0,8
ХБП С1-2	187 (71,7 %)	83 (63,4%)	0,046
ХБП С3 (а,б) - С4	70 (26,8%)	40 (30,5%)	
ХБП С 5	4 (1,5%)	8 (6,1%)	
Непролиферативная ДР	90 (36%)	53 (41,4%)	0,043
Пролиферативная ДР	96 (38,4%)	31 (24,2%)	
Полная потеря зрения	2 (0,8%)	2 (1,6%)	
Время, прошедшее до обращения за специализированной помощью	108,15 ± 210,5	109,04 ± 278,56	0,97
Распределение язвенных дефектов в зависимости от длительности существования до обращения (дни)			0,54
≤ 30	170 (50,6 %)	72 (43,1 %)	
31- 90	80 (23,8 %)	47 (28,1 %)	
91-180	37 (11 %)	18 (10,8 %)	
181-365	24 (7,1%)	16 (9,6%)	
> 365	25 (7,4 %)	14 (8,4%)	

Причина возникновения язвенного дефекта: -послеоперационная рана (вскрытие флегмоны, ампутации в пределах стопы) -любая внешняя травма	47 (16,3 %) 241 (83,7%)	22 (14,6 %) 129 (85,4%)	0,68
Плантарная локализация язвенного дефекта	272 (81,1 %)	134 (80,4 %)	0,9
Распределение больных в зависимости от глубины язвенного дефекта по классификации Вагнера I ст. II ст. III ст. IV ст.	16 (4,8%) 250 (74,6%) 70 (20,6 %) 0 (0 %)	8 (4,8%) 126 (75,4%) 28 (16,8 %) 5 (3 %)	0,012
Распределение пациентов в зависимости от площади язвенного дефекта < 1 см ² 1-5 см ² > 5 см ²	303 (90,1 %) 33 (9,9 %) 0 (0 %)	157 (94,3 %) 9 (5,1 %) 1 (0,6 %)	0,13
Количество язвенных дефектов с признаками	118 (35,3%)	54 (32,5%)	0,55

инфицирования при первичном обращении			
--	--	--	--

СДС- синдром диабетической стопы. Числовые данные представлены как среднее со стандартное отклонением ($m \pm SD$), номинальные как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Пациенты с нейро-ишемической формой поражения были достоверно старше, имели ХБП С 4 и 5 стадии в большем проценте случаев, у них чаще встречался некроз всех слоев кожи. У пациентов с нейропатической формой СДС была чаще диагностирована пролиферативная стадия диабетической ретинопатии. По таким параметрам как пол, тип диабета, контроль углеводного обмена, скорость обращения за специализированной помощью, локализация, размер и инфицирование язвенного дефекта при первичном обращении различий между формами СДС не выявлено (Таблица 14).

В таблице 15 представлены исходы язвенных дефектов при различных формах СДС.

Таблица 15. Исходы лечения язвенных дефектов при нейропатической и нейро-ишемической формах синдрома диабетической стопы.

Исход	СДСн (n= 336)	СДСни (n= 167)	p
Заживление	294 (87,2%)	113 (67,7%)	0,0001
Продолжают лечиться	31 (9,2%)	30 (18)	0,004
Смерть	2 (0,6%)	2 (1,2%)	0,405
Ампутации всего	10 (3%)	22 (13,2%)	
на уровне стопы	9 (2,6%)	14 (8,4%)	0,005
на уровне голени	1 (0,3%)	2 (1,2%)	0,538
на уровне бедра	0	6 (3,6%)	0,01

СДС- синдром диабетической стопы, СДСн - нейропатическая форма синдрома диабетической стопы, СДСни- нейро-ишемическая форма синдрома диабетической стопы.

Числовые данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

У пациентов с нейропатической формой СДС заживление за год наступало достоверно в большем проценте случаев, тогда как ампутации на всех уровнях, включая малые, выполнялись значительно реже, чем у пациентов с нейро-ишемической формой СДС. Следует отметить, что у пациентов с нейропатическими язвенными дефектами ни одной ампутации бедра выполнено не было. Кроме того, немаловажным является общее небольшое количество выполненных высоких ампутаций за исследуемый период времени (5 лет).

Значимыми предикторами выполнения высоких ампутаций в общей когорте явились возраст, нарушение магистрального кровотока в артериях нижних конечностей, глубина раневого дефекта по классификации Вагнера и уровень гликированного гемоглобина (Таблица 16, Рисунок 9).

Таблица 16. Предикторы выполнения высоких ампутаций в когорте пациентов с синдромом диабетической стопы, получающих специализированную амбулаторную помощь.

Предикторы	Общая когорта пациентов с СДС (n=503)		
	ОШ	95% ДИ	p
Возраст, увеличение на 10 лет	3,54	1,4-8,93	0,006
Пол (М vs Ж)	0,53	0,14-2,0	0,54
Размер раны : <1 см ² vs ≥1 см ²	0,92	0,11-7,94	0,77
Обращение за специализированной помощью, увеличение на 1 неделю	0,95	0,3-1,5	0,28
HbA1c, увеличение на 1%	1,76	1,24-2,51	0,001
Инфекция: есть vs нет	0,31	0,07-1,31	0,13
Глубина раны: поверхностная (I-II ст. по Вагнеру) vs глубокая (III- IVст. по Вагнеру)	5,88	2,05-34,02	0,003

Нарушение магистрального кровотока: нет vs есть	15,68	2,1-135,9	0,001
--	-------	-----------	-------

ОШ- отношение шансов наступления события (в данной ситуации- высокой ампутации конечности); ДИ- доверительный интервал, HbA1c- гликированный гемоглобин.

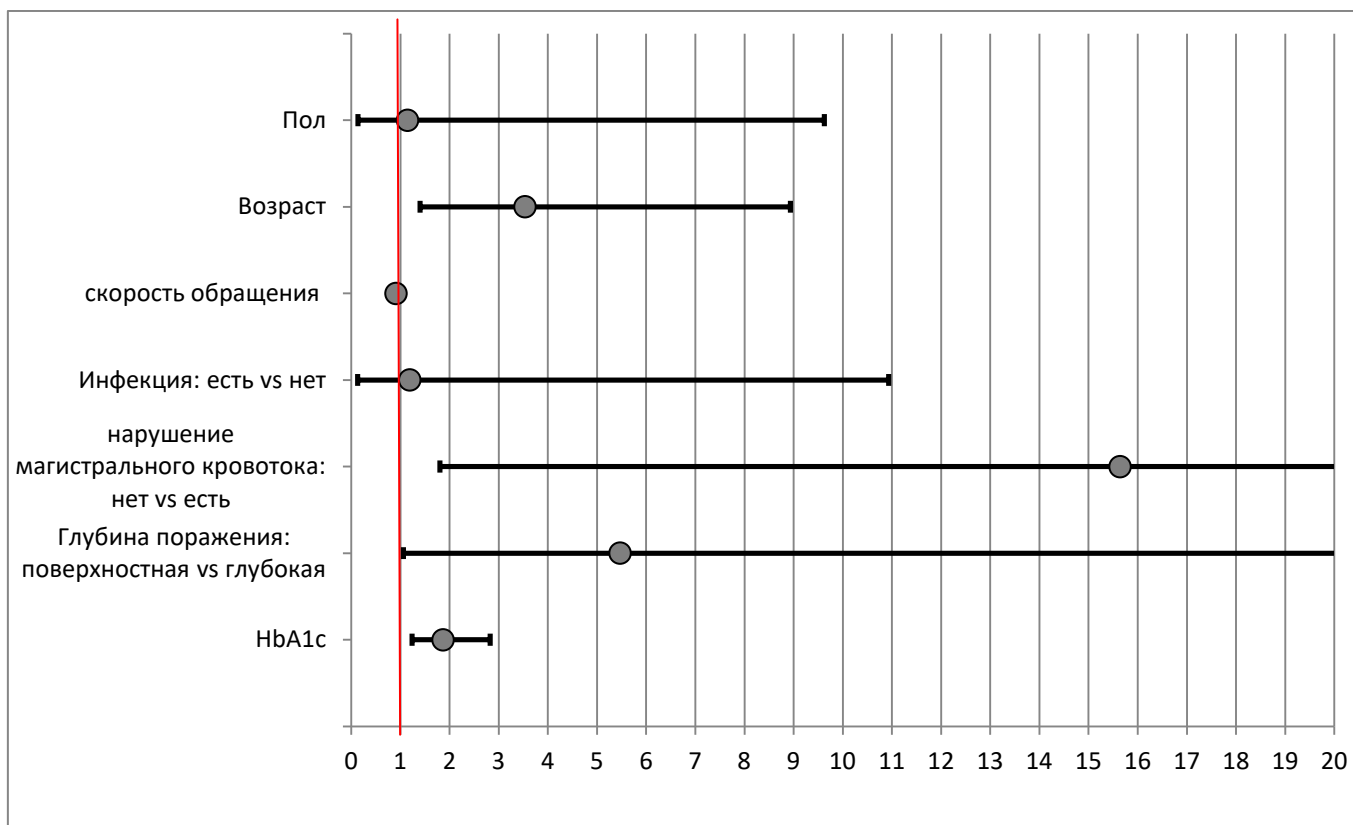


Рисунок 9. Предикторы выполнения высоких ампутаций у пациентов с синдромом диабетической стопы. Значимое влияние оказывают предикторы, интервал значений которых не пересекает линию, соответствующую 1: возраст ($p=0,006$), нарушение магистрального кровотока ($p=0,001$), глубина поражения по классификации Вагнера ($p=0,003$), HbA1c ($p=0,001$).

Таким образом, в общей группе пациентов с СДС предикторами выполнения высоких ампутаций явились: возраст, уровень HbA1c, глубина поражения язвенного дефекта по классификации Вагнера, нарушение магистрального кровотока в артериях пораженной конечности. При этом, риск выполнения высоких ампутаций возрастает в 3,5 раза при увеличении возраста на каждые 10 лет; в 1,76 раз при увеличении уровня HbA1c на 1%,; в 5,8 раз при вовлечении в процесс сухожилий, костей и глубжележащих слоев

тканей; в 15,68 раз при наличии нарушения магистрального кровотока в пораженной конечности.

При стратификации пациентов по наличию или отсутствию нарушения магистрального кровотока в пораженной конечности значимые предикторы выполнения высоких ампутаций были выявлены только в отношении пациентов с нейро-ишемической формой СДС. В этой группе риск выполнения высоких ампутаций возрастал в 3,2 раза при увеличении возраста на каждые 10 лет; в 1,69 раз при увеличении уровня HbA1c на 1%; в 7,53 раза при вовлечении в процесс костей, сухожилий и глубжележащих слоев тканей. Анализ группы пациентов с сохранным магистральным кровотоком не выявил объективных предикторов выполнения у них высоких ампутаций (Таблица 17).

Таблица 17. Предикторы выполнения высоких ампутаций в когорте пациентов с СДС, получающих специализированную амбулаторную помощь.

Предикторы	СДСн (n=336)			СДСни (n= 167)		
	ОШ	95% ДИ	p	ОШ	95% ДИ	p
Возраст, увеличение на 10 лет	2,29	1,87-2,81	0,42	3,23	0,91-11,82	0,048
Пол (М vs Ж)	0,99	0,98-1,01	0,53	0,716	0,17-2,98	0,739
Размер раны : >1 см ² vs ≥1 см ²	1,0	0,99-1,00	0,81	1,28	0,14-11,94	0,6
Период до обращения за специализированной помощью увеличение на 1 неделю	0,44	0,23-1,4	0,49	0,95	0,45-1,65	0,29
HbA1c, увеличение на 1%	1,68	0,66-4,31	0,27	1,69	1,14-2,5	0,007
Инфекция: Есть vs нет	0,99	0,98-1,01	0,35	0,35	0,08-1,63	0,22
Глубина раны:	1,02	0,99-1,05	0,20	7,53	1,7-33,3	0,009

Поверхностная (I-II ст. по Вагнеру vs III-IV ст по Вагнеру) гл						
Нарушение магистрального кровотока: нет vs есть	-	-	-	-	-	-

ОШ- отношение шансов наступления события (в данной ситуации - выполнения высокой ампутации конечности); ДИ- доверительный интервал, СДСн- нейропатическая форма синдрома диабетической стопы, СДСни- нейро-ишемическая форма синдрома диабетической стопы.

Параметры, относящиеся к характеристикам пациента, такие как пол, тип СД, вид сахароснижающего лечения, наличие и степень выраженности осложнений СД значимого влияния на частоту выполнения высоких ампутаций, по полученным нами данным, не оказывают.

На следующем этапе, проводилось выявление факторов, влияющих на заживление и незаживление язвенных дефектов в результате проведения консервативных мероприятий в течение года. В таблице 18 приведена сравнительная характеристика заживших и не заживших язвенных дефектов.

Таблица 18. Сравнительная характеристика пациентов с зажившими и не зажившими язвенными дефектами при синдроме диабетической стопы, получающих лечение в специализированном амбулаторном отделении диабетической стопы.

Параметр	Зажили	Не зажили	p
Количество	406 (86,9%)	61 (13,1%)	
Возраст, годы	62,6 ± 11,33	62,73 ± 10,73	0,69
Пол			
М	185 (83%)	38 (17%)	0,078
Ж	145 (89,5%)	17 (10,5%)	
Тип СД :			
СД 1 типа	32 (88,9%)	4 (11,1%)	0,55
СД 2 типа	300 (85,2%)	52 (14,8%)	

НbA1c (%)	8,2 ± 1,67	8,1 ± 1,97	0,21
Период времени до обращения за специализированной помощью:			
< 30 дней	209 (51,5%)	16 (26,2%)	0,0001
31- 90 дней	97 (23,9%)	18 (29,5%)	
91- 180 дней	45 (11%)	7 (11,5%)	
181 -365 дней	30 (7,4%)	7 (11,5%)	
> 365 дней	25 (6,2%)	13 (21,3%)	
Причина возникновения язвенного дефекта			
После хирургического вмешательства	53 (13%)	17 (28%)	0,006
Любая другая причина	352 (87%)	44 (72%)	
Форма СДС:			
СДСн	293 (72%)	31 (51 %)	0,001
СДСни	113 (28%)	30 (49%)	
Расположение язвенного дефекта			
плантарное	320 (79 %)	48 (79 %)	0,54
не плантарное	86 (21 %)	13 (21%)	
Глубина язвенного дефекта			
кожа, подкожная клетчатка	331 (82%)	49 (80%)	0,46
глубоко лежащие ткани	75 (18%)	12 (20%)	
Размер			

< 1 см ²	370 (91,1%)	51 (84%)	0,23
1-5 см ²	33 (8%)	10 (16%)	
> 5 см ²	3 (0,9%)	0 (0%)	
Инфекция при первичном обращении			
Есть	135 (33%)	19 (31%)	0,44
Нет	271 (67%)	42 (69%)	

СДС- синдром диабетической стопы. СДСн- синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. СДС ни- синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма. Числовые данные представлены как среднее со стандартное отклонением ($m \pm SD$), номинальные как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Пациенты с зажившими и незажившими язвенными дефектами отличались продолжительностью язвенного дефекта до обращения за специализированной помощью. Среди заживших ран было достоверно больше ран, длительность существования которых не превышала 30 дней. Среди незаживших ран было больше тех, которые образовались вследствие хирургического вмешательства и с нарушенным магистральным кровотоком. По другим параметрам, относящимся как к пациенту, так и к язвенному дефекту отличий между группами не было.

Для выявления параметров, одновременно воздействующих и оказывающих влияние на исход (заживление или не заживление в течение года), был применен метод бинарной логистической регрессии. Значимыми предикторами отсутствия заживления в результате консервативных мероприятий в течение года явились нарушение магистрального кровотока и несвоевременное обращение за специализированной медицинской помощью (Таблица 19, Рисунок 10).

Таблица 19. Предикторы не заживления язвенных дефектов в результате консервативных мероприятий в когорте пациентов с синдромом диабетической стопы, получающих специализированную амбулаторную помощь.

Предикторы	Общая когорта пациентов с СДС (n=503)		
	ОШ	95% ДИ	p
Возраст, увеличение на 10 лет*	1,19	0,67-1,27	0,25
Пол (М vs Ж)	0,59	0,33-1,07	0,88
Размер раны : >1 см ² vs ≥1 см ²	1,44	0,75-2,74	0,29
Обращение за специализированной помощью, увеличение на 1 месяц	1,07	1,03-1,11	0,001
НbA1c, увеличение на 1%	0,95	0,79-1,16	0,71
Локализация: плантарная vs тыльная	0,966	0,44- 1,88	0,53
Инфекция: Есть vs нет	1,15	0,65-2,02	0,67
Глубина раны: поверхностная vs глубокая	0,92	0,47-1,88	0,48
Нарушение магистрального кровотока: нет vs есть	2,01	1,18-3,43	0,014

ОШ- отношение шансов наступления события (в данной ситуации-отсутствие заживления в течение года); ДИ- доверительный интервал., СДС- синдром диабетической стопы.

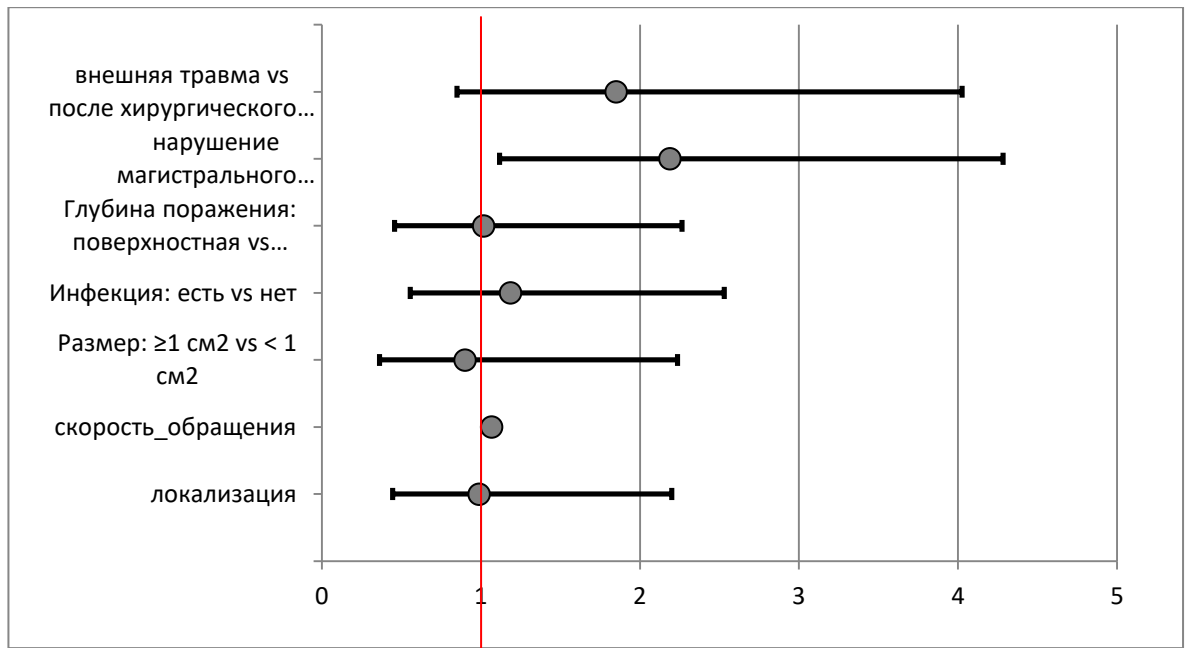


Рисунок 10. Предикторы отсутствия заживления язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы в результате консервативного лечения. Значимое влияние оказывают параметры, интервал значений которых не пересекает отметку, соответствующую 1: нарушение магистрального кровотока: нет vs есть ($p=0,014$) и скорость обращения за специализированной помощью ($p=0,0001$).

Таким образом, в общей группе пациентов с язвенными дефектами при СДС предикторами отсутствия заживления в течение года в результате консервативных мероприятий явились своевременность обращения за специализированной помощью и нарушение магистрального кровотока в пораженной конечности. При этом, риск отсутствия заживления возрастает в 2 раза при наличии нарушения магистрального кровотока в пораженной конечности и в 1,07 раз при отсрочке обращения за специализированной помощью на 1 месяц.

При стратификации когорты по состоянию магистрального кровотока предиктором не заживления в обоих случаях было несвоевременное обращение за специализированной медицинской помощью и размер более 1 см² при нейропатической форме СДС (Таблица 20).

Таблица 20. Предикторы отсутствия заживления язвенных дефектов в результате консервативных мероприятий в когорте пациентов с различными формами синдрома диабетической стопы, получающих специализированную амбулаторную помощь.

Предикторы	СДСн (n= 337)			СДСни (n= 167)		
	ОШ	95% ДИ	p	ОШ	95% ДИ	p
Возраст, увеличение на 10 лет	0,94	0,63-1,41	0,76	1,49	0,86-2,55	0,15
Пол (М vs Ж)	0,56	0,25-1,26	0,18	0,65	0,27-1,5	0,4
Размер раны : >1 см ² vs ≥1 см ²	2,25	1-5,06	0,05	0,78	0,25-2,46	0,79
Сроки обращения за специализированной помощью, увеличение на 1 месяц	1,07	0,62-1,83	0,015	1,08	1,01-1,16	0,017
НbA1c, увеличение на 1%	0,98	0,76-1,28	0,93	0,92	0,67-1,25	0,57
Локализация: плантарная vs тыльная	0,67	0,25-1,8	0,5	1,44	0,55-3,77	0,44
Инфекция: Есть vs нет	0,95	0,45-2,01	0,52	1,4	0,58-3,4	0,52
Глубина раны: поверхностная vs глубокая	0,68	0,25-1,81	0,5	1,3	0,5-3,35	0,62
Нарушение магистрального кровотока: нет vs есть	-	-	-	-	-	-

ОШ- отношение шансов наступления события (в данной ситуации-отсутствие заживления в течение года), ДИ- доверительный интервал, НbA1c- гликированный гемоглобин. СДСн- нейропатическая форма синдрома диабетической стопы, СДСни- нейро-ишемическая форма синдрома диабетической стопы.

Не выявлено влияния параметров, относящихся как к пациенту (возраст, пол, тип СД, НbA1c), так и к язвенному дефекту (локализация, глубина поражения, инфицирование при первичном обращении) .

Средние сроки обращения за специализированной медицинской помощью в группе пациентов с зажившими язвенными дефектами по сравнению с незажившими составили 86 ± 163 (дней) vs 223 ± 469 (дней), $p=0,0001$, Рисунок 11)

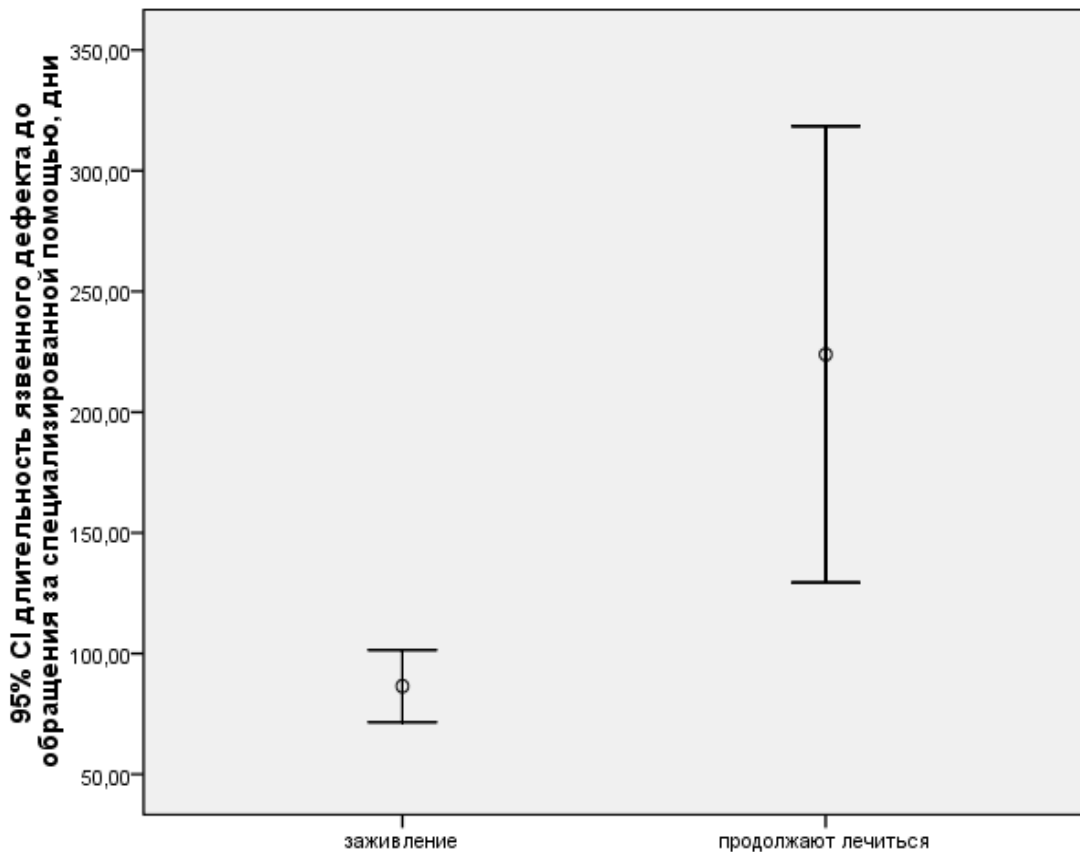


Рисунок 11. Средние сроки обращения за специализированной помощью пациентов с зажившими и не зажившими за год язвенными дефектами при синдроме диабетической стопы.

3.1.2. Анализ сроков заживления язвенных дефектов

Средние сроки заживления язвенных дефектов при СДС анализировались в группе язвенных дефектов, заживших в результате консервативных мероприятий без выполнения каких-либо хирургических вмешательств ($n=384$) и составили 134 дня (93; 178). 49% язвенных дефектов зажили за 90 дней, 46 % - за год, из них: 27% за 180 дней (6 месяцев), 12 % и

7,6% за 270 (9 месяцев) и 365 дней соответственно. 4,9% язвенных дефектов не зажили за год (Рисунок 12)

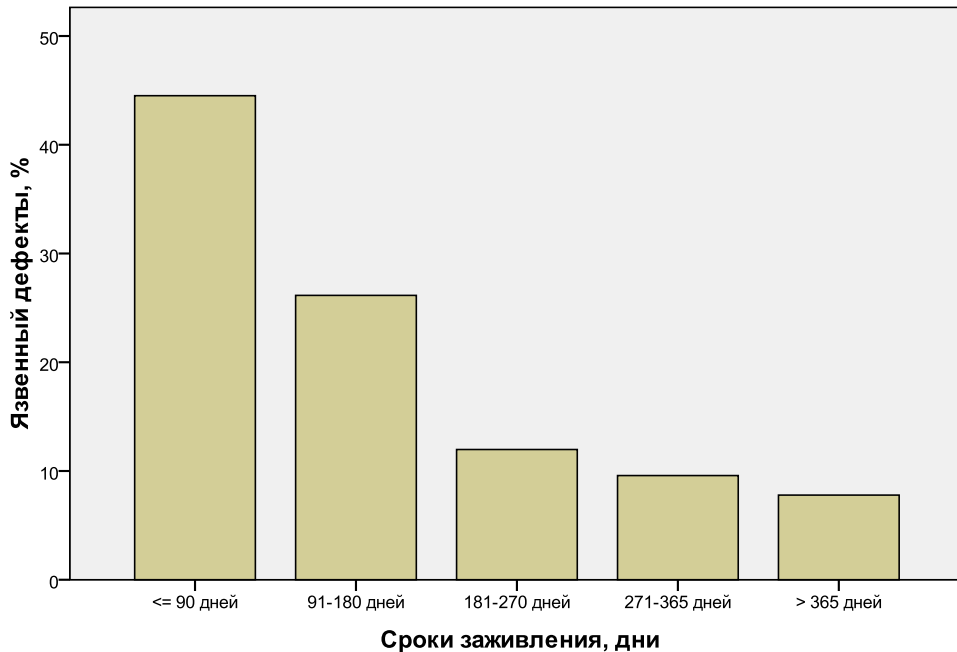


Рисунок 12. Соотношение язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы, заживших за 90 дней (3 месяца), 91-180 дней (6 месяцев), 181-270 дней (9 месяцев), 271-365 дней (12 месяцев), более 365 дней.

В таблице 21 представлены данные сравнительной характеристики клинических параметров пациентов с зажившими и незажившими язвенными дефектами при СДС в течение года.

Таблица 21. Сравнительная характеристика пациентов с синдромом диабетической стопы, заживших за ≤ 90 , 91-180, 181-270, 271-365, > 365 дней и не заживших за 365 дней.

параметр	Сроки заживления, дни					p
	≤ 90 (n= 188)	91-180 (n=102)	181-270 (n= 46)	271 - 365 (n= 29)	> 365 (n=19)	
Пол						
М	105 (57,1%)	67 (61,5%)	31 (56,4%)	27 (60%)	25 (61%)	0,94
Ж	79	42	24	18	16	

	(42,9%)	(38,5%)	(43,6%)	(40%)	(39%)	
Возраст, годы	62,07 ± 12,54	62,81 ± 10	64,04 ± 9,37	61,56 ± 10,89	63,00 ± 9,90	0,77
Тип СД:						
1	27 (14,5%)	10 (9,1%)	2 (3,6%)	2 (4,4%)	2 (4,9%)	0,045
2	159 (85,5%)	100 (90,9%)	54 (96,4%)	43 (95,6%)	39 (95,1%)	
HbA1c, % (M ± SD)	8,31 ± 1,82	8,18 ± 1,62	8,1 ± 1,81	7,97 ± 1,54	8,22 ± 1,65	0,8
Длительность язвенного дефекта (дни)						
≤ 30	124 (55,6%)	62 (46,6%)	23 (38,3%)	16 (33,3%)	18 (46,2%)	0,0001
31- 90	59 (26,5%)	29 (22,1%)	17 (28,3%)	14 (29,2%)	7 (17,9%)	
91-180	21 (9,4%)	22 (16,8%)	5 (8,3%)	3 (6,3%)	3 (7,7%)	
181-365	10 (4,5%)	11 (8,4%)	9 (15%)	7 (14,6%)	3 (7,7%)	
> 365	9 (4%)	8 (6,1%)	6 (10%)	8 (16,7%)	8(20,5%)	

Количество больных с разными формами СДС:						
СДС н	142 (75,5%)	76 (74,5%)	31 (67,4%)	17 (58,6%)	7 (36,8%)	0,003
СДС ни	46 (24,5%)	26 (25,5%)	15 (32,6%)	12 (41,4%)	12 (63,2%)	
Причина возникновения поражения,						
любая внешняя травма	167 (89,3%)	87 (85,3%)	39 (84,8%)	23 (79,3%)	16 (84,2%)	0,015
послеоперационная рана	19 (10,1%)	15 (15%)	6 (13%)	5 (17%)	2 (10,5%)	
Локализация:						
Плантарная	146 (81,1%)	81 (80,2%)	28 (63,6%)	25 (86,2%)	16 (84,2%)	0,087
Не плантарная	34 (18,9%)	20 (19,8%)	16 (36,4%)	4 (13,8%)	3 (15,8%)	
Глубина раны по Вагнеру :						
I	23 (12,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,0001
II	138 (73,8%)	85 (83,3%)	35 (76,1%)	22 (75,9%)	14 (73,7%)	
III	26 (13,9%)	15 (14,7%)	11 (23,9%)	7 (24,1%)	5 (26,3%)	
IV	0 (0)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0)	
Размер раны:						
< 1 см ²	170	94	38	23	16	

$\geq 1 \text{ см}^2$	(96,6%) 6 (3,4%)	(93%) 7 (7%)	(82,6%) 8 (17,4%)	(85,2%) 4 (14,8%)	(88,9%) 3 (15,8%)	0,021
Инфицирование раны есть	58 (31%)	37 (36,3%)	15 (33,3%)	7 (24,1%)	9 (47,4%)	0,458
нет	129 (69%)	65 (63,7%)	30 (66,7%)	22 (75,9%)	10 (52,6%)	

СДС- синдром диабетической стопы. СДСн- синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. СДС ни- синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма. Числовые данные представлены как среднее со стандартное отклонением ($m \pm SD$), номинальные как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Согласно полученным данным, язвенные дефекты, зажившие в течение 3-х месяцев протекали на фоне адекватного магистрального кровотока в нижних конечностях, были менее глубокими (I, II ст. по классификации Вагнер), меньшего размера. По таким параметрам, как локализация и инфицирование при первичном обращении достоверных отличий между группами не получено. Следует отметить, что, язвенные дефекты, зажившие за 3 месяца, отличались меньшей длительностью существования. Среди хронических ран, заживших за 3 месяца, большинство существовало в пределах 30 дней. Не отмечено различий в скорости заживления хронических язвенных дефектов по таким параметрам как пол, возраст, контроль углеводного обмена. Выявлено, что у пациентов с СД 1 типа достоверно больше ран, заживших за 90 и 180 дней (3 и 6 месяцев соответственно).

Данные по срокам заживления язвенных дефектов при стратификации по состоянию магистрального кровотока отражены в таблице 22.

Таблица 22. Сроки заживления язвенных дефектах при нейропатической и нейро-ишемической формах синдрома диабетической стопы

	СДСн (n= 337)	СДСни (n= 167)	p
Сроки заживления, дни	92 (44; 175)	140 (58; 272)	0,001

Данные представлены как Me (25%; 75%). СДСн- нейропатическая форма синдрома диабетической стопы, СДСни- нейро-ишемическая форма синдрома диабетической стопы.

Условно оптимальными сроками в международной практике признано заживление за 90 дней (3 месяца). Для выявления факторов, влияющих на заживление хронических язвенных дефектов при СДС был применен метод регрессии Кокса. По полученным данным, на сроки заживления в течение 90 дней (3-х месяцев) значимо влияют: длительность существования раны до обращения за специализированной медицинской помощью ($p= 0,0132$), наличие сохранного магистрального кровотока [$p= 0,036$], Рисунок 13], глубина поражения по классификации Вагнера ($p=0,0001$). При этом, достоверно более высокая вероятность заживления за 3 месяца выявлена только в отношении поверхностных язвенных дефектов (I ст. по Вагнеру), процент которых в исследуемой когорте составил 12,3% (23 язвенных дефекта). Для язвенных дефектов, II-III степени по Вагнеру, которые составляют большинство, вероятность заживления за 90 дней не зависит от глубины поражения (Рисунок 14).

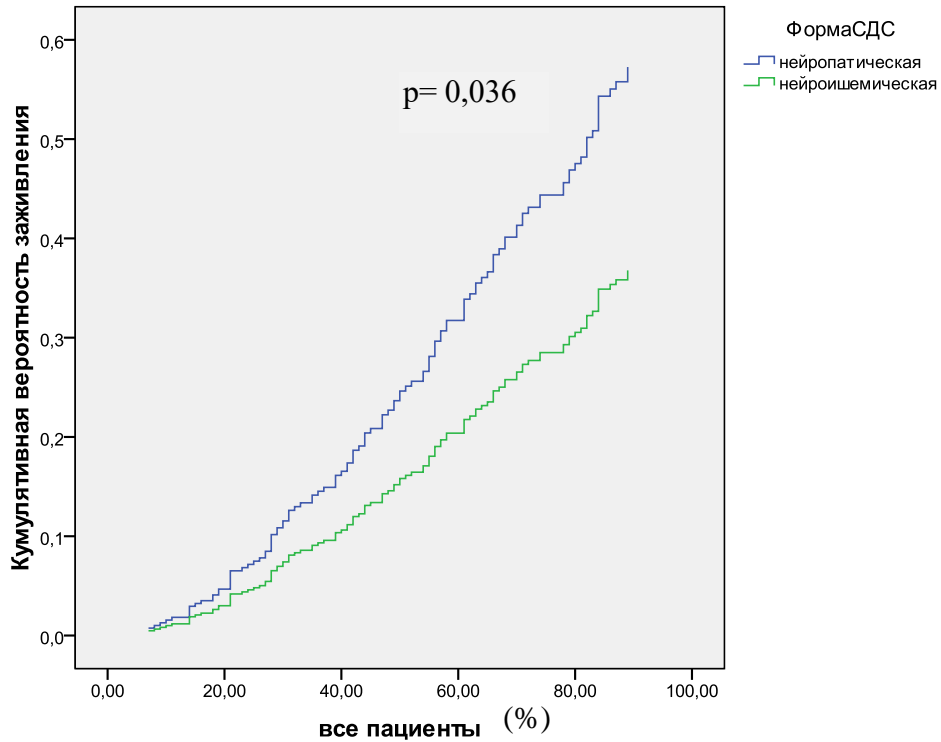


Рисунок 13. Кумулятивная вероятность заживления нейропатических и нейро-ишемических язвенных дефектов у пациентов с синдромом диабетической стопы за 90 дней.

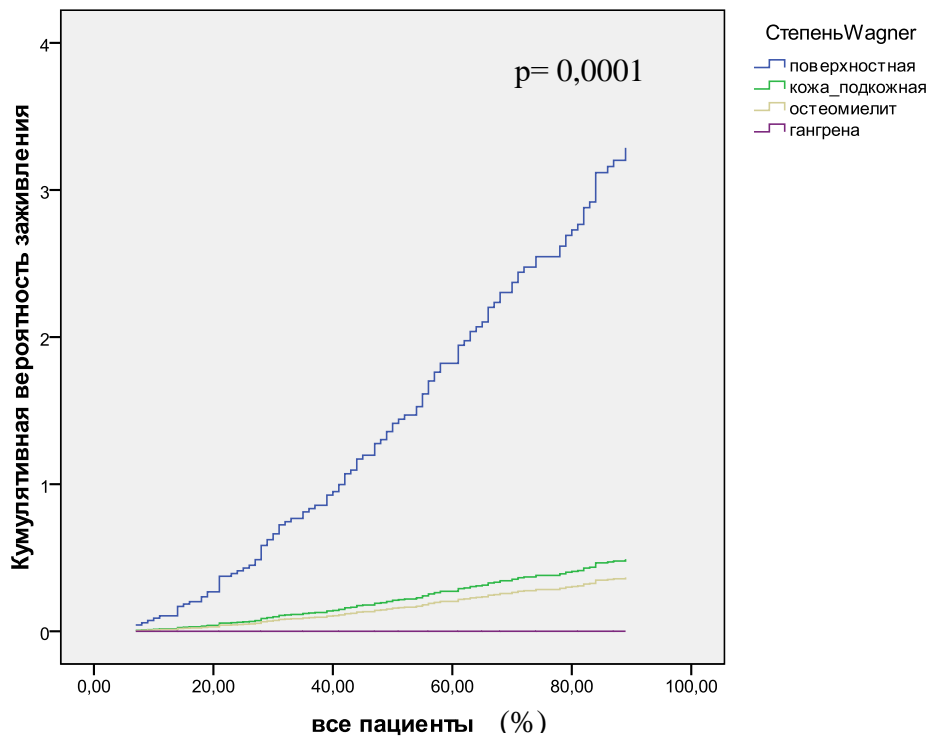


Рисунок 14. Кумулятивная вероятность заживления язвенных дефектов разной глубины за 90 дней.

Раны размером до 1см^2 включительно имеют более высокую вероятность заживления за 3 месяца, что вполне ожидаемо по сравнению с ранами размером от 1 до 5см^2 . Раны, превышающие 5см^2 , такой вероятности не имеют совсем (рисунок 15).

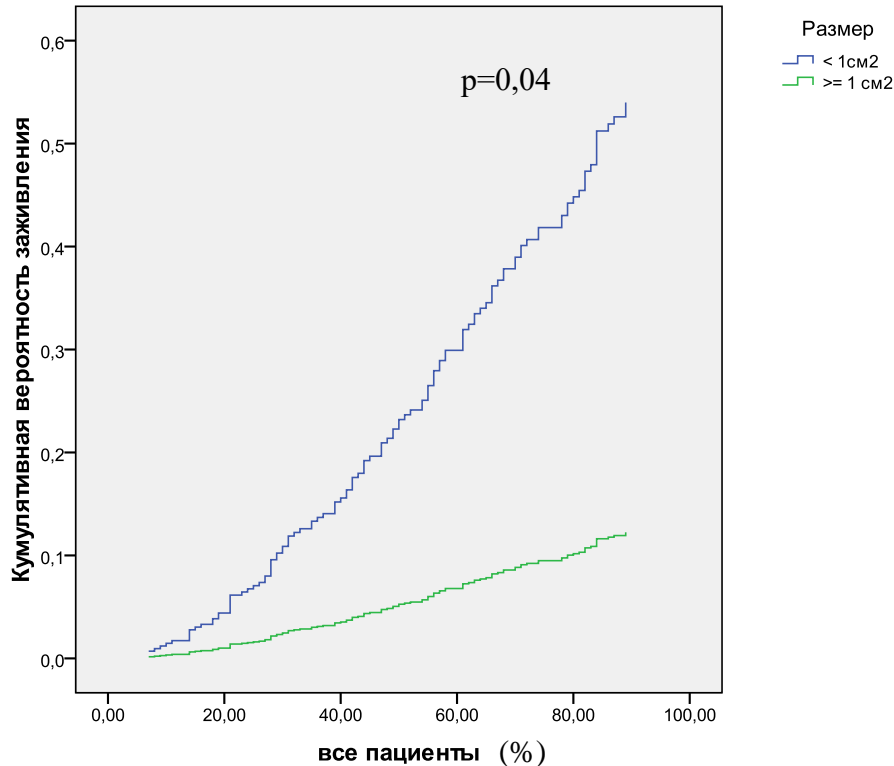


Рисунок 15. Кумлятивная вероятность заживления язвенных дефектов разного размера за 90 дней.

Таким образом, по полученным нами данным на выборке с достаточным количеством наблюдений в течение 5 лет, количество высоких ампутаций составило 1,8%. Следует обратить особое внимание на тот факт, что HbA1c является независимым предиктором выполнения высоких ампутаций. Повышение уровня HbA1c на 1% у пациентов с нарушением магистрального кровотока в 1,8 раз увеличивает риск потери конечности выше голеностопного сустава. В 50% случаев хронические раны заживают в течение 12 недель, в 46% не заживают в оптимальные сроки, в 4,6% язвенные

дефекты не заживают за год и более. В настоящее время прогноз и дифференцированный подход к лечебной тактике определяется по состоянию магистрального кровотока в артериях пораженной конечности. Данный параметр является независимым фактором риска выполнения ампутаций на уровне бедра. Внедрение в алгоритмы лечебной тактики совместного ведения таких пациентов с сосудистыми хирургами привело к минимальному количеству высоких ампутаций - (1,8%), что указывает на возможность контроля этого параметра в настоящее время. То же самое можно сказать в отношении инфекции и плантарной локализации язвенных дефектов. По полученным нами данным своевременное назначение антимикробной терапии и режима разгрузки приводят к тому, что указанные выше параметры не оказывают негативного влияния на заживление язвенного дефекта и его сроки, а также на частоту выполнения высоких ампутаций. Учитывая достаточно высокий процент язвенных дефектов, не эпителизирующихся в условно оптимальные сроки, остается нерешенным вопрос о поиске других факторов, влияющих на заживление хронических ран и ее скорость. За исключением небольшого размера раны и глубины поражения, клинических параметров, оказывающих влияние на скорость заживления раны, получено не было. При этом, количество поверхностно расположенных ран в отношении которых получены значимые различия вероятности заживления раны за 3 месяца, в исследуемой когорте было минимальным. Поэтому этот параметр не может являться критерием персонализации лечебной тактики язвенных дефектов при СДС.

Следует обратить внимание на такой параметр как длительность существования раны до обращения за специализированной помощью. В данной модели он выступает в качестве независимого фактора, влияющего как на сам факт заживления, так и на вероятность заживления в более короткие сроки. Корреляций с другими параметрами, такими как размер раны и ее глубина выявлено не было.

В этой связи, большой научный и клинический интерес представляет разработка новых подходов к персонализации терапии пациентов с СДС. С этой целью был проведен анализ морфологических характеристик язвенных дефектов у пациентов с СДС. Учитывая тот факт, что негативное влияние нарушенного магистрального кровотока на течение заживления хронических раневых дефектов хорошо изучено, в дальнейший анализ включались язвенные дефекты с адекватным магистральным кровотоком (нейропатической формой СДС).

3.2 Морфологические особенности язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы

Этапы проведения морфологического анализа образцов язвенных дефектов пациентов с нейропатической формой СДС отражены на рисунке 16.

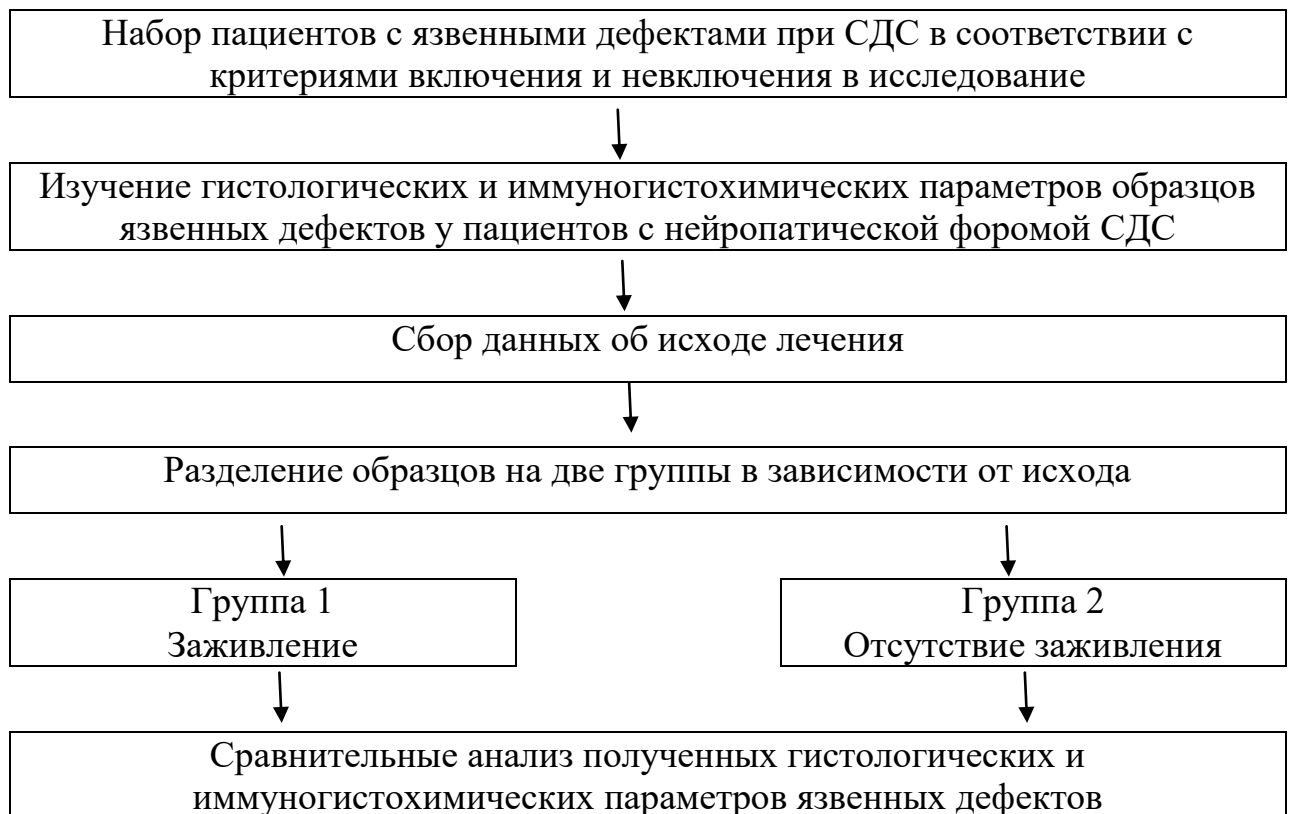


Рисунок 16. Дизайн морфологического анализа образцов язвенных дефектов у больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы.

3.2.1. Выявление морфологических фенотипов раневых дефектов при синдроме диабетической стопы

Были проанализированы 89 образцов, соответствующих критериям включения и не включения в анализ (таблица 23)

Таблица 23. Клиническая характеристика обследованной группы пациентов с язвенными дефектами при нейропатической форме синдрома диабетической стопы

Параметр	Значение
Количество образцов	89
СД1/СД2	14 (15,7%)/75 (84,3%)
Возраст, годы	58,29 ± 8,62
Пол (М/Ж)	59 (70%)/30 (30%)
Длительность СД, годы	14,71 ± 9,72
Сахароснижающая терапия:	
инсулинотерапия	54 (60,7%)
пероральные сахароснижающие препараты	20 (22,4%)
комбинированная терапия	15 (16,9%)
НbA1c, %	8,2 ± 1,6
Пролиферативная ретинопатия	12 (28%)
Терминальная стадия нефропатии, ХБП С4-5	7 (17%)
Нейропатический дисфункциональный счет, баллы	14,36 ± 3,65
Вибрационная чувствительность; Вольты	47,49 ± 12
Тактильная чувствительность при помощи монофиламента 10г сохранена	20 (22,5%)

ослаблена	22 (24,7%)
отсутствует	47 (52,8%)
Длительность существования раны до обращения за специализированной помощью, дни	41 (9; 110)
Причина возникновения язвенного дефекта:	
Любая травма (механическая, термическая)	55 (61,8%)
После хирургического вмешательства	34 (38,2%)
Локализация:	
плантарная	66 (74,2%)
не плантарная	23 (25,8%)

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$), целое с процентным отношением (n, %). СД- сахарный диабет, ХБП- хроническая болезнь почек

Таким образом, это были язвенные дефекты у пациентов, которые длительно болели СД и имели средний уровень HbA1c $8,2 \pm 1,6\%$. У всех больных были отмечены выраженные признаки периферической полинейропатии (НДС - $14,36 \pm 3,65$ балла; вибрационная чувствительность - $47,49 \pm 12$ (Вольт); 52,8% пациентов не чувствовали прикосновение монофиламента весом 10 грамм. В подавляющем большинстве случаев (74%) язвенные дефекты располагались на плантарной поверхности и были следствием механической или термической травмы (61,8%). Длительность существования раны до обращения за специализированной помощью варьировала от 9 до 2075 дней с крайне неравномерным распределением, составив в среднем 41 день. В таблице 24 представлены усредненные морфологические показатели образцов исследуемой группы.

Таблица 24. Морфологическая характеристика образцов, полученных из язвенных дефектов у больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы.

Количество образцов	89
Грануляции (%)	51 ± 27
Некроз (%)	17 ± 21

Фиброз (%)	32±26
------------	-------

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением (M ± SD).

К особенностям морфометрии образцов язвенных дефектов при СДС относится одновременное присутствие тканей, характерных для разных стадий репарации. Это может указывать на наличие признаков хронизации раневого процесса исследуемых язвенных дефектов. При этом, соотношение грануляций, фиброза и некроза в ранах сопоставимых по своим клиническим характеристикам, было различным.

После окончания исследования и получения данных об исходе язвенного дефекта (заживление или отсутствие заживления), образцы были разделены на две группы: группа 1 (n= 56) - биопсии язвенных дефектов, заживших на фоне проведения консервативных мероприятий за год; группа 2 (n=33) - биопсии язвенных дефектов не заживших на фоне проведения консервативных мероприятий за год. Сравнительный анализ морфометрии образцов, принадлежащих к разным группам, отражен в Таблице 25.

Таблица 25. Сравнительный анализ морфометрии образцов язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы, заживших (Группа 1) и не заживших (Группа 2) на фоне проведения консервативных мероприятий в течение года.

Параметр	Группа 1 (n= 56)	Группа 2 (n=33)	p
Грануляции (%)	60 ± 19	33 ± 23	0,0001
Некроз (%)	14 ± 16	28±26	0,004
Фиброз (%)	29 ± 18	39 ± 22	0,02

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением (M ± SD). Для сравнения числовых значений применялся метод сравнения средних с вычислением t- критерия Стьюдента.

Таким образом, образцы язвенных дефектов, заживших и не заживших в результате консервативных мероприятий, достоверно отличались по соотношению некроза, грануляций и фиброза, что позволяет выделить различные виды морфологических фенотипов (МФ). Для язвенных дефектов МФ 1 вида, соответствующих 1 группе, характерно статистически значимое более высокое содержание грануляционной ткани, при меньшем содержании некротической и фиброзной тканей. Тогда как, во 2 группе (МФ 2 вида) отмечено преобладание фиброза.

Для определения репарационного потенциала ран на основании выявленных различий морфометрии образцов был предложен расчет коэффициента репарации (КР):

$$\text{Коэффициент репарации} = \frac{\text{Грануляции (\%)}}{\text{Фиброз (\%)} + \text{Некроз (\%)}}$$

Соответственно, чем больше значение КР, тем выше репарационный потенциал раны. Выявленные морфологические фенотипы достоверно различались по КР [МФ 1 вида $2.29 \pm 3,04$ vs МФ 2 вида $0.95 \pm 1,78$, $p=0,024$) Рисунок 17].

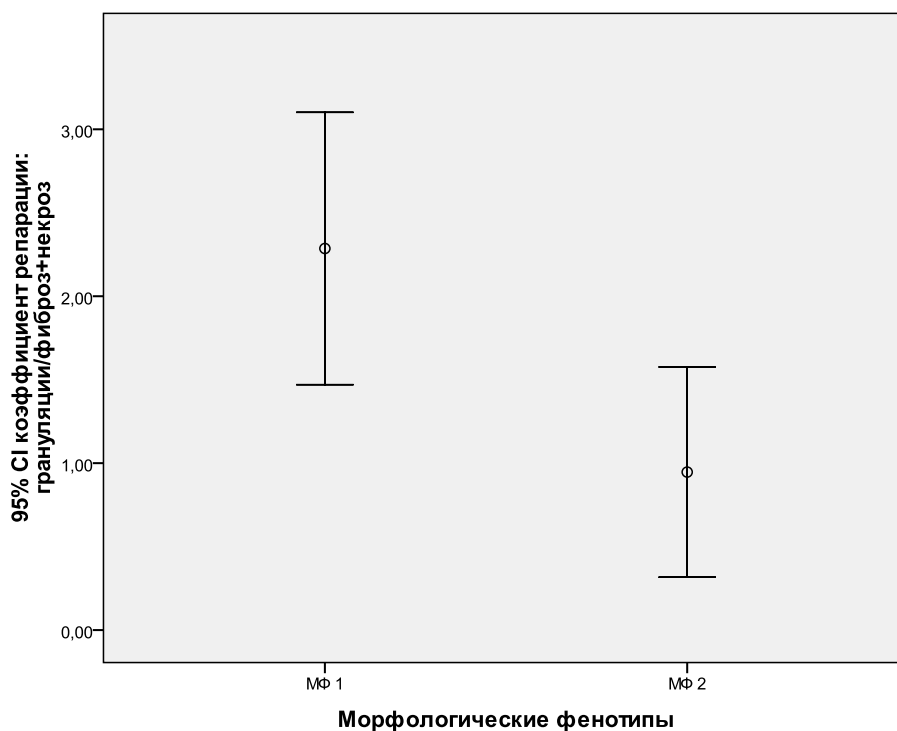


Рисунок 17 Коэффициент репарации язвенных дефектов различных морфологических фенотипов.

3.2.2 Анализ молекулярного профиля выявленных морфологических фенотипов

На данном этапе была поставлена задача изучения молекулярного профиля выявленных морфологических фенотипов. Для этой цели исследовалась экспрессия следующих иммуногистохимических параметров в образцах:

- факторы роста (СЭФР, ИФР, ЭФР) и рецепторы к ним (СЭФРр, ИФРр, ЭФРр);
- маркеры пролиферации: Ki67, SMA, панцитокератин;
- наличия в ране клеток, экспрессирующих маркеры стволовости : ALDH, CD34.

Результаты иммуногистохимического анализа экспрессии факторов роста и рецепторов к ним в биоптатах представлены в Таблицах 26 и 27.

Таблица 26. Соотношение количества клеток, экспрессирующих факторы роста в образцах нейропатических язвенных дефектов с различными морфологическими фенотипами.

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n=56)	2 вид (n=33)	
СЭФР, %	81	19	0,0001
СЭФРр, %	96	4	0,0001
ИФР, %	100	0	0,0001
ИФРр, %	89	11	0,0001
ЭФР, %	98	2	0,0001
ЭФРр, %	84	16	0,0001
Общее количество клеток, экспрессирующих факторы роста, %	93	7	0,0001
Общее количество клеток, экспрессирующих факторы роста, %	90	10	0,0001

Данные представлены как процентное выражение от абсолютного значения (%).

Таблица 27. Количественное содержание факторов роста и их рецепторов в грануляционной ткани образцов нейропатических язвенных дефектов с различными морфологическими фенотипами.

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n= 56)	2 вид (n=33)	
СЭФР, баллы	4,64 ± 1,2	0,36 ± 0,88	0,0001
СЭФРр, баллы	4,27 ± 1,12	0,22 ± 0,64	0,0001

ИФР, баллы	2,91 ± 1,33	0,00 ± 0,00	0,0001
ИФРр, баллы	2,64 ± 1,16	0,00 ± 0,00	0,0001
ЭФР, баллы	2,36 ± 0,04	0,04 ± 0,3	0,0001
ЭФРр, баллы	2,32 ± 0,86	0,04 ± 0,3	0,0001

Данные представлены как среднее и стандартное отклонение ($m \pm SD$).

Как представлено в таблицах 26 и 27, в образцах с МФ 1 вида экспрессия факторов роста и рецепторов к ним была значимо выше как по качественным показателям, так и по количественным значениям.

В качестве маркеров пролиферации были выбраны ядерный белок Кі 67, гладкомышечный актин (SMA) и циотокератин (СК). Кі 67 экспрессируется в большинстве фаз митотического цикла и является универсальным маркером пролиферативной активности клеток. Определение его содержания используется в различных областях медицины, включая онкологию. В случае хронизации раневого процесса, было выдвинуто предположение, что по его уровню можно оценить репаративный потенциал тканей раны. Согласно полученным данным, раневые дефекты с морфологическими фенотипами 1 и 2 достоверно отличаются по уровню экспрессии Кі67 [18 ± 6 vs 4 ± 5 (%), $p=0,0001$; Рисунки 18, 19].

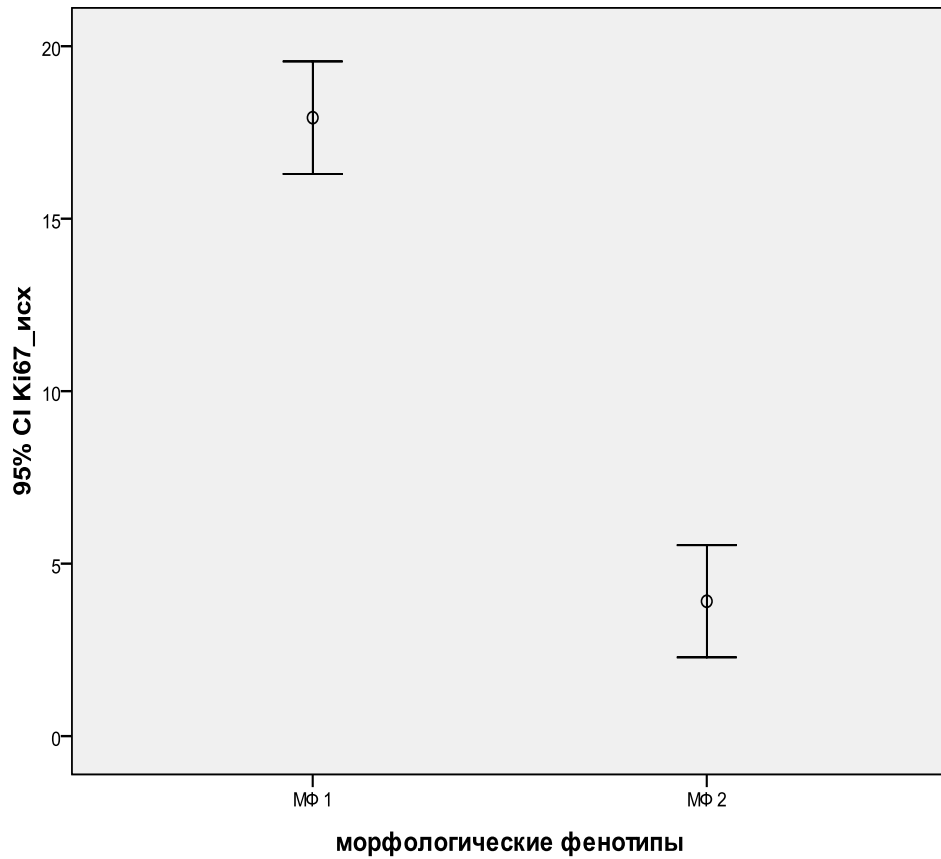


Рисунок 18. Экспрессия ядерного белка Ki67 в грануляционной ткани образцов с разными морфологическими фенотипами.

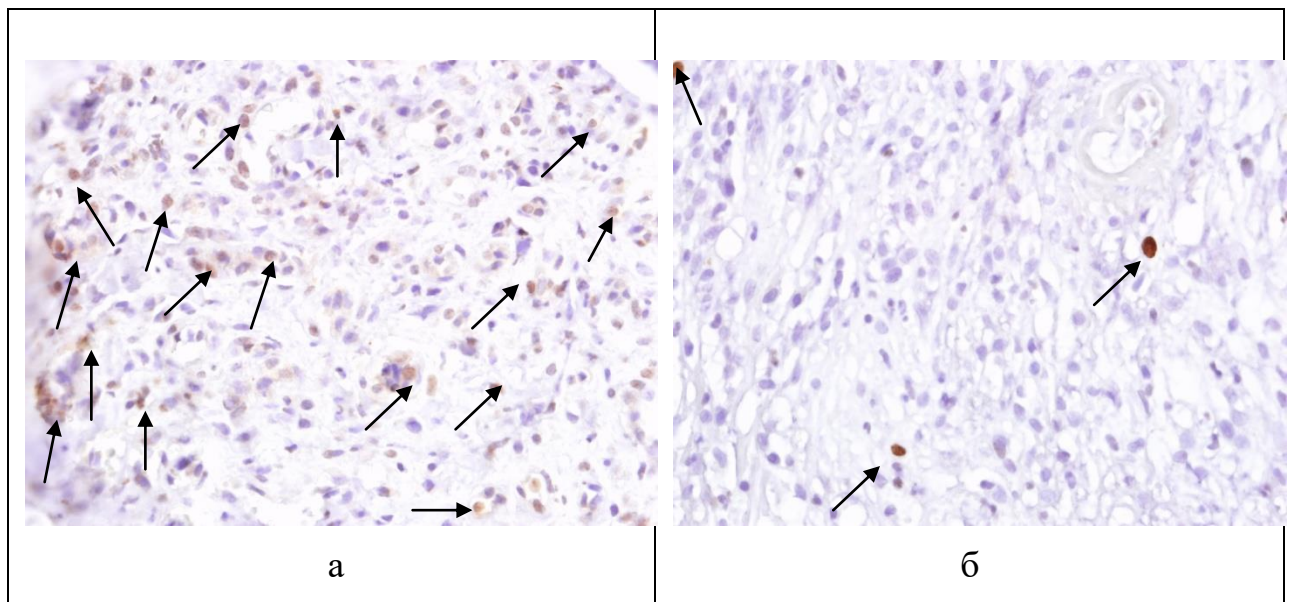


Рисунок 19. Микрофотографии экспрессии Ki 67 в ядрах клеток грануляционной ткани ран с морфологическими фенотипами 1 (а) и 2 (б), увеличение x 400. Стрелками указаны Ki 67

Экспрессия ядерного белка Ki67 тесно связана с количеством грануляционной ткани в образце. Коэффициент корреляции Пирсона между этими величинами составляет 0,6 ($p < 0,001$). На диаграмме рассеяния (рисунок 20) показано соотношение уровней грануляций и Ki67. Следует отметить, что в ряде случаев достаточно высокое содержание грануляций (40-60%) сопровождалось низкими ($< 5\%$) значениями Ki67 (выделены овалами). Можно предположить, что в данном случае речь идет о, так называемой, «вялой» грануляционной ткани, которая имеет низкий репаративный потенциал.

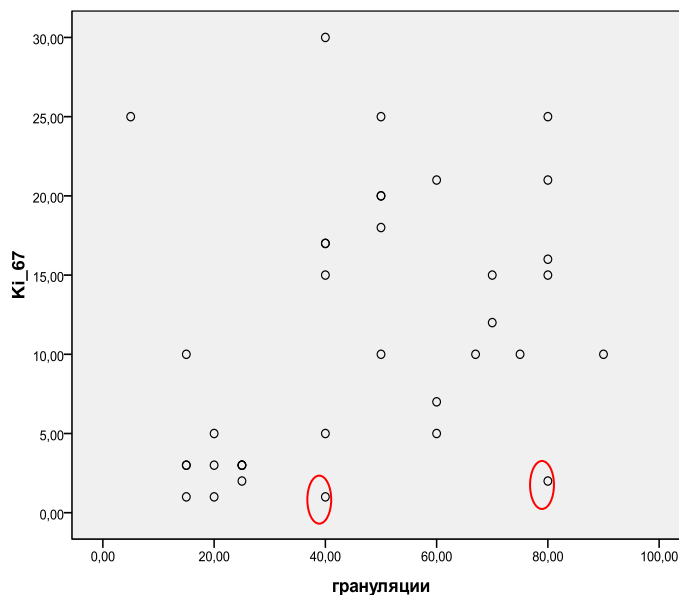


Рисунок 20. Диаграмма рассеяния значений грануляционной ткани и Ki67.

Гладкомышечный актин (SMA) – это белок, который экспрессируется гладкомышечными клетками и миофибробластами. В свою очередь миофибробласты являются одними из ключевых клеток в заживлении ран. То есть, SMA может служить маркером наличия миофибробластов, непосредственно участвующих в заключительной стадии заживления. Эпителизация завершает заживление раны, что может быть оценено по

экспрессии цитокератинов . В таблицах 28 и 29 представлены качественные и количественные показатели экспрессии SMA и СК

Таблица 28. Соотношение количества клеток, экспрессирующих гладкомышечный актин (SMA) и панцитокератин (СК) в образцах нейропатических язвенных дефектов с различными морфологическими фенотипами.

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n=56)	2 вид (n=33)	
SMA, %	81	19	0,0001
СК, %	85	15	0,0001

Данные представлены как процентное выражение от абсолютного значения (%).

Таблица 29. Экспрессия гладкомышечного актина (SMA) и панцитокератина (СК) в раневых дефектах с различными морфологическими фенотипами.

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n=56)	2 вид (n=33)	
SMA, %	4,18 ± 0,4	1,56 ± 0,28	0,0001
СК, %	6,27 ± 6,87	0,93 ± 1,62	0,0001

Данные представлены как среднее и стандартное отклонение (M±SD).

Таким образом, образцы ран с разными видами МФ достоверно отличались по качественным и количественным показателям экспрессии гладкомышечного актина и панцитокератина.

Наличие клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток CD34 и альдегиддегидрогеназы 1 типа (ALDH 1) оценивалось по уровню экспрессии ALDH1 и CD 34. Альдегиддегидрогеназы (ALDH) представляют собой семейство внутриклеточных энзимов, в функции которых входит, помимо окисления альдегидов, защита стволовых клеток от окислительного стресса.

В этой связи, уровень экспрессии ALDH1 используется в качестве маркера наличия стволоподобных клеток при различных онкологических заболеваниях. CD 34 - трансмембранный фосфогликопротеин, экспрессируется на гематопоетических стволовых клетках, обладающих в том числе и проангиогенной активностью. Определение уровня экспрессии ALDH1 и CD 34 в практическом здравоохранении используется в основном при диагностике и дифференциальной диагностике различных онкологических заболеваний. В нашей работе было выдвинуто предположение о том, что наличие в хронических ранах незрелых клеток, способных к дальнейшей дифференцировке может оказывать влияние на течение процесса заживления. В таблицах 30 и 31 представлены показатели экспрессии ALDH1 и CD 34 в образцах ран с различными видами МФ.

Таблица 30. Соотношение количества клеток, экспрессирующих ALDH1 и CD 34 в образцах нейропатических язвенных дефектов с различными морфологическими фенотипами.

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n=56)	2 вид (n=33)	
ALDH1, %	81	19	0,0001
CD 34,%	75	25	0,0001

Данные представлены как процентное выражение от абсолютного значения (%).

Таблица 31. Экспрессия ALDH1 и CD 34 в ранах с различными морфологическими фенотипами

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n=56)	1 вид (n=33)	
ALDH 1, %	2,43 ± 2,27	1,02±1,87	0,0001
CD 34,%	1.68 ± 1,01	0,76 ± 0,14	0,0001

Данные представлены как среднее и стандартное отклонение (M±SD).

Образцы ран с МФ 1 вида имели достоверно большее количество клеток, экспрессирующих рецепторы стволовых клеток.

При сравнительном анализе клинических характеристик пациентов с разными видами МФ значимая разница получена в отношении своевременности обращения пациентов за специализированной помощью и причины возникновения хронической раны. Пациенты с язвенными дефектами, принадлежащими к МФ 1 вида, обращались достоверно раньше. Раны послеоперационной этиологии значимо чаще имели МФ 1 вида. По таким клиническим параметрам, как возраст, пол, тип СД, длительность и уровень контроля основного заболевания, степень выраженности нейропатии, локализация поражения различий между группами не выявлено (Таблица 32).

Таблица 32. Сравнительная характеристика клинических параметров пациентов с синдромом диабетической стопы с язвенными дефектами разных морфологических фенотипов.

Параметр	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n=56)	2 вид (n=33)	
Возраст, годы	58 ± 9	59 ± 9	0,66
Длительность СД, годы	14,2 ± 11,55	15,25 ± 7,44	0,68
Количество дней до обращения за специализированной помощью, дни	50,45 ± 55,84	276,76 ± 443,22	0,001
HbA1c, %	8,08 ± 1,72	8,36 ± 1,49	0,43
ВЧ, вольты	48,49 ± 12,08	46,37 ± 11,99	0,45
НДС, баллы	14,34 ± 4,04	14,35 ± 3,2	0,99

Плантарная локализация	41 (73%)	25 (76 %)	0,79
Причины возникновения раны:			
Любая травма (механическая, термическая)	29 (52%)	26 (79%)	0,014
Послеоперационная рана	27 (48%)	7 (21%)	

Данные представлены как среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$) и как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

HbA1c- гликированный гемоглобин. ВЧ- вибрационная чувствительность.

НДС- нейропатический дисфункциональный счет.

По сокращению площади за 4 недели лечения в специализированном отделении диабетической стопы язвенные дефекты были разделены на 4 группы: 1 - > 50 %; 2 - 30-49%; 3 - 10-29%; 4 - < 10%. Хронические раны пациентов с низкой динамикой сокращения площади поражения (< 10%) в достоверно большем проценте случаев принадлежали к МФ2 вида и не заживали в результате консервативных мероприятий [6% vs 88,9%, $p = 0,0001$ (таблица 33)].

Таблица 33. Распределение язвенных дефектов с морфологическими фенотипами разных видов в зависимости от скорости сокращения их площади за 4 недели лечения.

Сокращение площади язвенного дефекта за 4 недели	Морфологические фенотипы		p
	1 вид (n,%)	2 вид (n,%)	
> 50%	11 (20 %)	0 (0%)	0,0001
30-49 (%)	21 (38%)	1 (3,7%)	

10-29%	20 (36,0%)	3 (7,4%)	
< 10%	6 (6,0%)	29 (88,9%)	

Данные представлены как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Таким образом, язвенные дефекты разных видов МФ имели достоверные отличия по длительности существования раны до обращения за специализированной помощью, причине возникновения нарушения целостности кожных покровов и скорости сокращения размеров раны за 4 недели лечения.

3.2.3 Анализ клинических, морфологических и иммуногистохимических характеристик хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы разной длительности

Учитывая, полученные данные о значимости своевременности обращения за специализированной помощью был проведен сравнительный анализ морфометрии образцов и иммуногистохимических характеристик язвенных дефектов разной длительности. Биоптаты из язвенных дефектов были разделены на 3 группы в зависимости от длительности существования ран: ≤ 90 дней (группа 1) – 63 образца; 91-365 дней (группа 2) - 17 образцов; > 365 дней (группа 3) – 9 образцов. В таблице 34 приведены данные клинических параметров обследуемых групп.

Таблица 34. Сравнительная характеристика клинических параметров обследуемых групп.

Параметр	Группа 1 (n = 63)	Группа 2 (n = 17)	Группа 3 (n = 9)	p
Возраст, годы	57,90 ± 8,75	58,06 ± 9,35	61,44 ± 6,15	0,52
Пол (М/Ж)	44/19	12/5	3/6	

	(70%/30%)	(71%/29%)	(33%/67%)	0,09
Тип СД (1/2)	9/54 (14%/86%)	4/13 (24%/76%)	1/8 (11%/89%)	0,6
Длительность СД, годы	15,0 ± 11,0	14,0 ± 8,2	14,2 ± 8,8	0,23
HbA1c, %	8,22 ± 1,72	8,49 ± 1,25	7,66 ± 1,2	0,51
Вибрационная чувствительность; Вольты	49,0 ± 10,0	48,0 ± 11,0	48,0 ± 10,0	0,12
НДС баллы	14 ± 3,8	14,5 ± 4,4	13,7 ± 4,7	0,55

НДС- нейропатический дисфункциональный счет Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$), целое число и его процентное соотношение (n,%).

Таким образом, сравнительный анализ выявил, что больные с разной длительностью язвенных дефектов были сопоставимы по таким клиническим характеристикам, как возраст, пол, тип СД и его длительность, уровень контроля углеводного обмена, наличие и степень тяжести периферической полинейропатии.

На первом этапе проводился сравнительный анализ морфометрии образцов исследуемой группы, включая коэффициент репарации (Таблица 35).

Таблица 35. Сравнительный анализ морфометрии биоптатов язвенных дефектов различной длительности при нейропатической форме синдрома диабетической стопы.

Параметр	Группа 1 (n=63)	Группа 2 (n=17)	Группа 3 (n = 9)	p
Грануляции,%	55,43 ± 21,83	45,00 ± 26,52	22,22 ± 13,94	0,0001
Некроз,%	21,71 ± 20,81	19,94 ± 18,59	24,44 ± 29	0,9
Фиброз,%	23,38 ± 18,49	35,59 ± 22,35	53,33 ± 29,26	0,003
Коэффициент	2,48 ± 3,53	1,03 ± 1,24	0,35 ± 0,25	0,021

репарации				
-----------	--	--	--	--

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$). С учетом неравномерного распределения данных для сравнительного анализа был вычислен непараметрический Н-критерий Краскала-Уолеса.

Как представлено в таблице, группа больных с наименьшей длительностью характеризовалась достоверно более высоким содержанием грануляционной ткани при невысокой выраженности фиброза и значимо более высоким показателем КР.

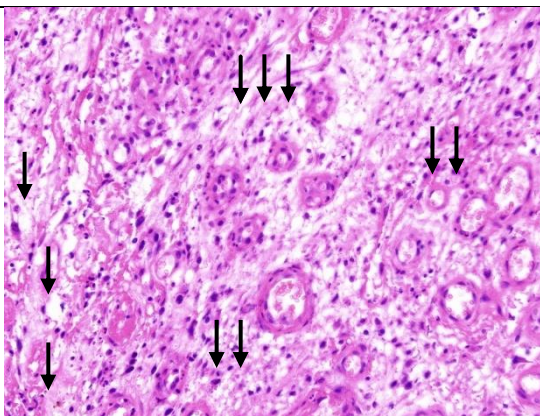
На рисунке 21 представлены фотографии макро- и микропрепаратов нейропатических язвенных дефектов различной длительности.



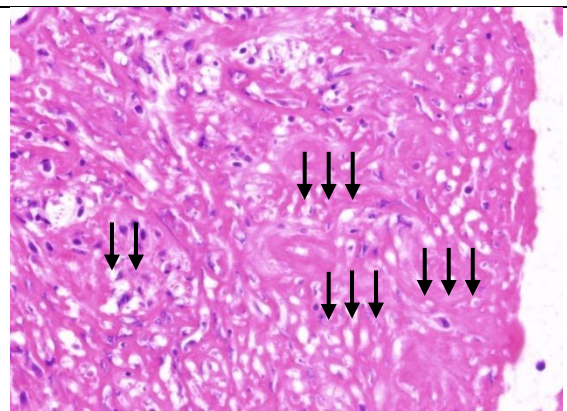
А. Фото нейропатического язвенного дефекта длительностью 180 дней



В. Фото нейропатического язвенного дефекта длительностью больше 365 дней



Б. Микрофотография нейропатического язвенного дефекта длительностью до 180 дней с полями некроза и грануляций.



Г. Микрофотография нейропатического язвенного дефекта длительностью больше 365 дней с превалированием фиброза.

Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 100.
Условные обозначения: ↓- участки некроза (Н), ↓↓ - грануляции (Г), ↓↓↓↓ - фиброз (Ф)

Рисунок 21. Нейропатические язвенные дефекты разной длительности. А, В – макропрепараты. Б, Г- микропрепараты.

На представленных фотографиях хорошо видно, что внешний вид нейропатических язвенных дефектов различной длительности при сопоставимости базовых характеристик (локализация, отсутствие видимых признаков инфекции) мало отличим. Однако, на микрофотографиях биопсийных образцов, окрашенных гематоксилином и эозином, хорошо заметны отличия. Если в ране длительностью меньше года (Рисунок 21 Б) практически в равной степени представлены участки грануляций и некроза, то в микроскопической картине язвенного дефекта длительностью больше года превалирует фиброзная ткань (Рисунок 21 Г).

На втором этапе проводился сравнительный анализ уровня экспрессии ядерного белка Ki 67, факторов роста и рецепторов к ним. В таблице 36 и на рисунке 22 представлены данные уровня экспрессии Ki 67.

Таблица 36. Уровень экспрессии ядерного белка Ki67 в язвенных дефектах разной длительности.

Параметр	Группа 1 (n=63)	Группа 2 (n=17)	Группа 3 (n = 9)	p
Ki 67, %	12,49 ± 8,0	9,94 ± 7,5	1,78 ± 2,05	0,001*

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением (M ± SD).

* разница достоверна между группами 1 и 3, 2 и 3.

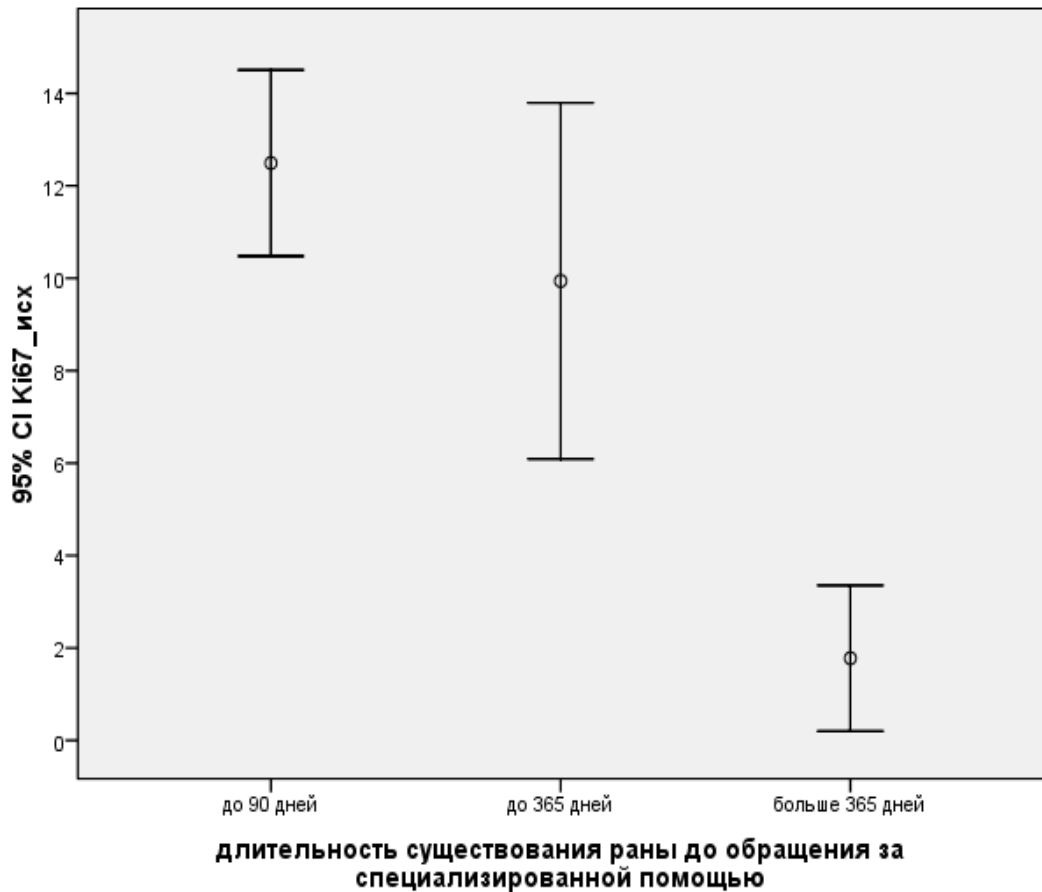


Рисунок 22. Экспрессия Кi 67 в грануляционной ткани нейропатических язвенных дефектов различной длительности.

Согласно данным, представленным в Таблице 36 и на Рисунке 20, раневые дефекты меньшей длительности обладают большей способностью к репарации, чем раны длительностью превышающей год.

Сравнительный анализ экспрессии факторов роста и рецепторов к ним представлен в таблицах 37, 38 и на рисунке 23.

Таблица 37. Соотношение клеток, экспрессирующих факторы роста и рецепторы к ним в грануляционной ткани образцов нейропатических язвенных дефектов различной длительности.

параметр	Группа 1 (n=63)	Группа 2 (n=17)	Группа 3 (N = 9)	p
СЭФР	45 (71,4%)	5 (29,4%)	1 (11,1%)	0,0001
СЭФР_p	45 (71,4%)	4 (23,5%)	0 (0%)	0,0001

ИФР	43 (68,3%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0,0001
ИФР_p	43 (68,3%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0,0001
ЭФР	43 (68,3%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0,0001
ЭФР_p	42 (66,7%)	1 (5,9%)	1 (11,1%)	0,0001

Данные представлены как целое с процентным отношением (n, %).

По данным в Таблице 38 количество клеток, экспрессирующих факторы роста и рецепторы к ним достоверно выше в ранах длительностью до 90 дней (3-х месяцев).

Таблица 38. Показатели экспрессии факторов роста и их рецепторов в грануляционной ткани образцов нейротических язвенных дефектов различной длительности.

параметр	Группа 1 (n=63)	Группа 2 (n=17)	Группа 3 (N = 9)	p
СЭФР, баллы	3,27 ± 2,36	0,71 ± 1,21	0,22 ± 0,67	0,0001*
СЭФР_p, баллы	2,98 ± 2,18	0,59 ± 1,18	0,0 ± 0,0	0,0001*
ИФР, баллы	2,00 ± 1,76	0,12 ± 0,49	0,0 ± 0,0	0,0001*
ИФР_p, баллы	1,81 ± 1,51	0,12 ± 0,49	0,0 ± 0,0	0,0001*
ЭФР, баллы	1,65 ± 1,32	0,12 ± 0,49	0,0 ± 0,0	0,0001*
ЭФР_p, баллы	1,59 ± 1,3	0,12 ± 0,49	0,0 ± 0,0	0,0001*

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением (M ± SD).

* разница достоверна между группами 1 и 2, 1 и 3.

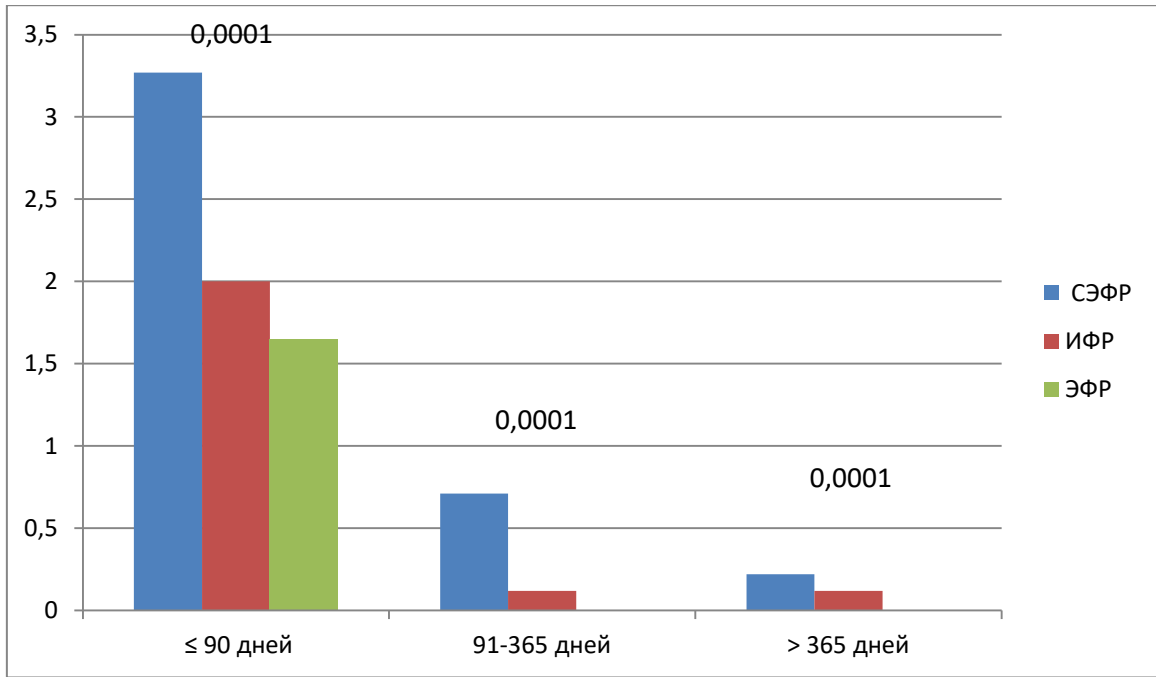


Рисунок 23 Показатели экспрессии факторов роста в ранах разной длительности. СЭФР- сосудистый эндотелиальный фактор роста; ИФР- инсулиноподобный фактор роста, ЭФР- эпидермальный фактор роста.

В образцах ран, длительность которых не превышала 90 дней, экспрессия факторов роста и рецепторов к ним была достоверно выше, чем в ранах большей длительности. Достоверной разницы в количественных показателях экспрессии факторов роста и рецепторов к ним между ранами длительностью до и более года не получено.

Для выявления взаимосвязи между экспрессией факторов роста и длительностью существования язвенного дефекта был выполнен корреляционный анализ между экспрессией ФР и их рецепторов и длительностью существования раны. Данные представлены в таблице 39.

Таблица 39. Корреляция между экспрессией факторов роста, рецепторами к факторам роста и длительностью существования язвенного дефекта.

Экспрессия факторов роста и рецепторов к нему	Коэффициент корреляции с длительностью существования раны	p
СЭФР	- 0,376	0,0001
СЭФР_p	-0,390	0,0001

ИФР	-0,360	0,0001
ИФР_p	-0,378	0,0001
ЭФР	-0,389	0,0001
ЭФР_p	-0,341	0,0001

Согласно данным корреляционного анализа экспрессия СЭФР и рецепторов к нему, рецепторов к ИФР, ЭФР и рецепторов к нему имеет значимую отрицательную зависимость от длительности существования раны, т.е. чем меньше длительность раны тем больше экспрессия ФР и рецепторов к нему.

В таблице 40 представлен сравнительный анализ частоты встречаемости морфологических фенотипов 1 и 2 видов в образцах разной длительности.

Таблица 40. Виды морфологических фенотипов в образцах ран разной длительности.

Морфологические фенотипы	Группа 1 (n=63)	Группа 2 (n=17)	Группа 3 (n = 9)	p
1 вид	48 (76, 2%)	8 (47,1%)	0 (0%)	0,0001
2 вид	15 (23,8%)	9 (52,9%)	9 (100%)	

Данные представлены как целое число и его процентное соотношение (n,%).

Как представлено в таблице, в ранах существующих до 3-х месяцев, в подавляющем большинстве случаев биоптаты принадлежат к МФ 1 вида (76%), тогда как образцы язвенных дефектов ран, существующих больше года в 100% случаев представлены МФ 2 вида.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о наличии зависимости между репарационным потенциалом язвенных дефектов, оцениваемым по коэффициенту репарации и уровню экспрессии ядерного белка Ki67 и длительностью существования язвенного дефекта. Кроме того,

нейропатические язвенные дефекты длительностью меньше 3-х месяцев характеризуются достоверно большим количеством факторов роста и рецепторов к ним по сравнению с ранами, существующими более длительно.

3.2.4 Факторы, определяющие вероятность заживления хронических язвенных дефектов при нейропатической форме синдрома диабетической стопы

Для выявления факторов, определяющих вероятность заживления раны в условиях одновременного влияния множества переменных, был применен метод «дерева решений». Данный метод позволяет построить модель, учитывающую влияние различных параметров на конкретное событие (в данном случае – заживление раны) и выбрать фактор или факторы, которые значимо влияют на вероятность его наступления. При этом в качестве переменных, возможно оказывающих влияние на заживление раны, были выбраны такие морфологические параметры как коэффициент репарации, уровень экспрессии Ki67 (%), факторы роста : СЭФР, ИФР, ЭФР, наличие клеток, экспрессирующих рецепторы к ALDH1 и CD34.

Согласно построенной модели, ключевым параметром заживления хронической раны при СДС является уровень экспрессии Ki67. По выявленному показателю возможны следующие варианты развития событий (Рисунок 24):

1. Уровень экспрессии Ki 67 $\leq 7\%$ [n= 34 (38,2%)]. В таком случае вероятность заживления низкая - 11,8%, а не заживления высокая - 88,2%. При этом, если количество грануляционной ткани в ране $\leq 50\%$, то вероятность незаживления крайне высокая - 96,3%. Если количество грануляционной ткани превышает 50%, то вероятность заживления составляет 43%, а незаживления 57%.

2. Уровень экспрессии Ki67 превышает 7% [n= 55 (62%)]. В этом случае вероятность заживления очень высокая и составляет 94%.

Если в ране присутствует панцитокератин, то вероятность заживления составляет 100%.

заживление

категория	%	n
да	62,9	56
нет	37,1	33
Всего	100%	89

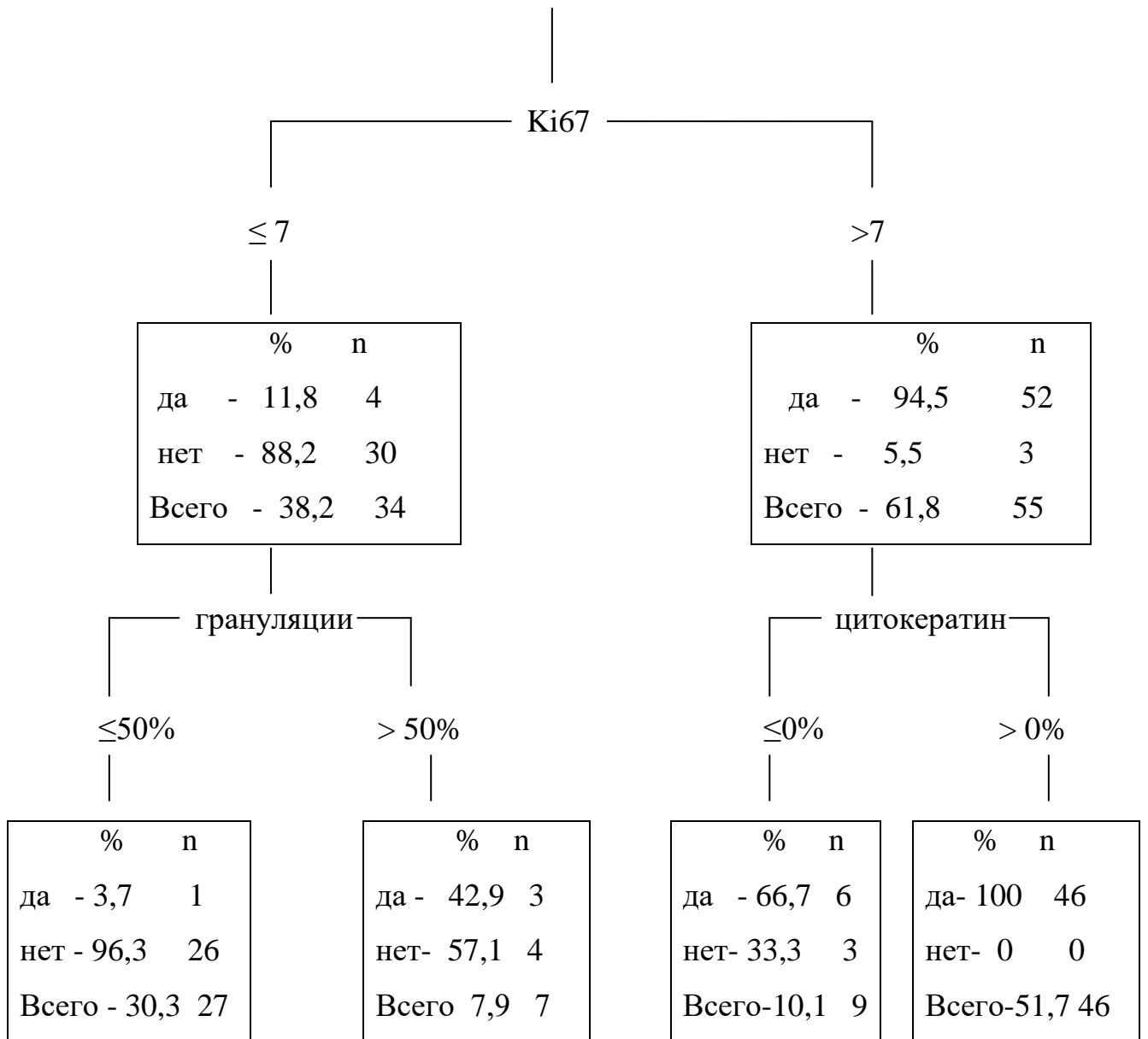


Рисунок 24. Диаграмма анализа "дерево решений" для выявления параметров, определяющих вероятность заживления язвенного дефекта в результате консервативных мероприятий.

Для выявления дополнительных маркеров заживления в результате консервативных мероприятий был проведен сравнительный анализ клинических характеристик пациентов и язвенных дефектов в группах, соответствующих выявленным показателям Ki67 (Таблица 41).

Таблица 41. Сравнительная характеристика клинических параметров, относящихся к пациенту и к язвенному дефекту в зависимости от экспрессии ядерного белка Ki67.

Параметр	Ki67		
	$\leq 7\%$ (n= 34)	$> 7\%$ (n=55)	
Возраст (годы)	58,18 \pm 8,67	58,36 \pm 8,7	0,92
Пол: М Ж	23 (68%) 11 (32%)	36 (66%) 19 (34%)	0,51
Тип СД 1 2	6 (18 %) 20 (82 %)	8 (14 %) 47 (86 %)	0,46
HbA1c (%)	8,12 \pm 1,7	8,28 \pm 1,56	0,64
Длительность раны до обращения за специализированной помощью (дни)	265,73 \pm 440,14	53,14 \pm 57,5	0,001
Причина возникновения язвенного дефекта: любая внешняя причина после хирургического вмешательства	28 (82%) 6 (18%)	27 (49%) 28 (51%)	0,001
Локализация: Плантарная Не плантарная	25 (74 %) 9 (26 %)	41 (75 %) 14 (26 %)	0,55
Размер раны: $\geq 1 \text{ см}^2$ $< 1 \text{ см}^2$	8 (24 %) 25 (76 %)	8 (15%) 46 (85%)	0,21

Сокращение площади раны за 4 недели консервативных мероприятий, %	8,98 ± 17,84	39,26 ± 19,7	0,0001
---	--------------	--------------	--------

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$) и как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Таким образом, к дополнительным маркерам заживления язвенного дефекта в течение года в результате консервативных мероприятий можно отнести следующие показатели:

- средняя длительность раны до обращения за специализированной помощью (53 дня);
- раны после хирургических вмешательств, не подвергшихся пластическому закрытию;
- сокращение площади поражения за 4 недели лечения (39%).

Клинические характеристики пациента, такие как возраст, пол, тип СД, уровень контроля углеводного обмена не могут использоваться в качестве дополнительных параметров заживления в течение года на фоне проведения консервативного лечения.

3.2.5 Факторы, определяющие скорость заживления хронических язвенных дефектов при нейропатической форме синдрома диабетической стопы

По срокам заживления образцы исследуемой выборки были разделены на три группы (Рисунок 25): группа 1- образцы язвенных дефектов, заживших за 3 месяца (n=14), группа 2- образцы язвенных дефектов, заживших в течение года (n=36), группа 3- образцы язвенных дефектов, заживших в срок, превышающий 365 дней (n=6).

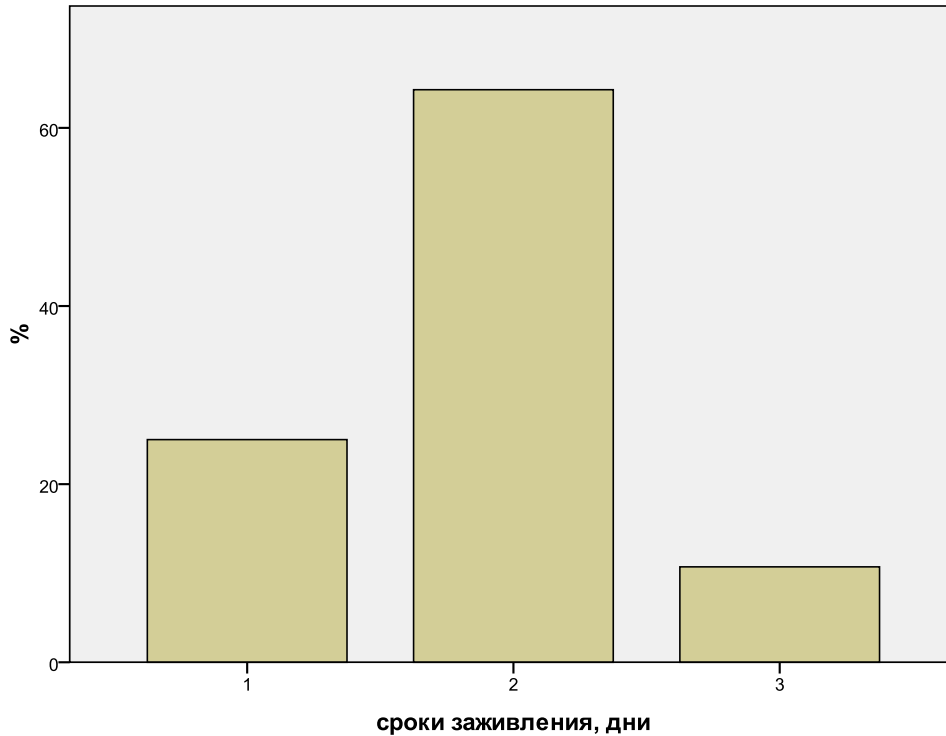


Рисунок 25. Распределение образцов по срокам заживления ран: 1- биоптаты ран, заживших в течение 90 дней (3-х месяцев); 2- биоптаты раны, заживших в течение 91- 365 дней (12-ти месяцев); 3- биоптаты ран, заживших в срок, превышающий 365 дней.

Для выявления факторов, определяющих вероятность заживления раны за 3 месяца в условиях одновременного влияния множества переменных, был применен метод «дерева решений». Для выявления параметров, определяющих вероятность заживления, при построении модели, оценивающей вероятность заживления раны за 3 месяца были выбраны такие морфологические параметры как коэффициент репарации, уровень экспрессии Ki67 (%), факторы роста: ИФР, ЭФР, СЭФР; наличие клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток: ALDH1 и CD34.

Параметром, определяющим высокую вероятность заживления раны за 3 месяца по нашим данным является уровень экспрессии CD 34 (Рисунок 26). При отсутствии в биоптате клеток, экспрессирующих этот маркер вероятность заживления хронической раны за 3 месяца равна 0, в пределах года 50% и более года 50%. При наличии в биоптате клеток,

экспрессирующих CD34 прогноз зависит от уровня экспрессии ядерного белка Ki67. Если он меньше или равен 10%, то вероятность заживления за 3 месяца составляет 0%, так же как и вероятность зажить более, чем за 365 дней. В такой ситуации все раны заживают в течение года. При уровне экспрессии Ki67 более 10% вероятность заживления за 3 месяца составляет 42,4 %, а в пределах от 90 до 365 дней - 57,6%.

Сроки заживления

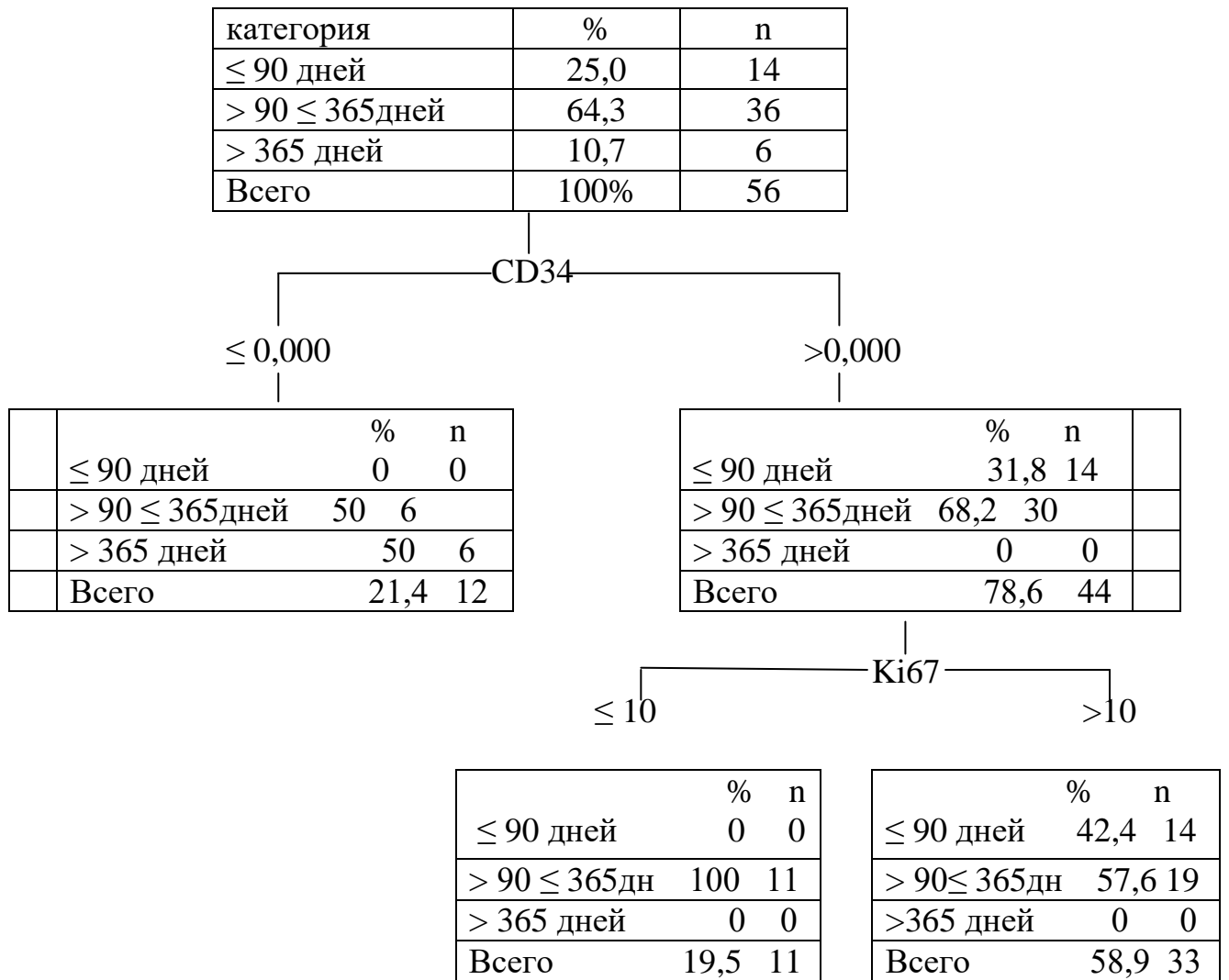


Рисунок 26. Диаграмма анализа "дерево решений" для выявления параметров, определяющих вероятность заживления язвенного дефекта в течение 3-х месяцев.

Таким образом, в процессе исследования образцов язвенных дефектов у пациентов СДС, сопоставимых по своим клиническим характеристикам, идентифицировано два морфологических фенотипа, характеризующихся разным репарационным потенциалом и имеющих различную вероятность заживления в результате консервативных мероприятий. Заживление и его скорость зависят от уровня экспрессии маркера ангиогенеза CD34 и ядерного белка Ki67.

ГЛАВА 4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА В ЛЕЧЕНИИ ЯЗВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ В АМБУЛАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

В клинической практике для ускорения процесса заживления длительно незаживающих язвенных дефектов могут применяться различные адьювантные средства местного лечения, в частности препараты, содержащие факторы роста. Данные об эффективности применения факторов роста у больных с СДС противоречивы. Для оценки эффективности применения этого вида лечения у больных с СДС в амбулаторной практике нами были проведены клинические исследования воздействия аппликаций аутоплазмы, обогащенной факторами роста на язвенный дефект и внутривенных инъекций эпидермального фактора роста.

4.1. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами в местном лечении язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы

Применение богатой тромбоцитами собственной плазмы пациента (platelet- rich plasma-PRP) в качестве местного лечения язвенных дефектов основано на предположении о том, что факторы роста, содержащиеся в α -гранулах тромбоцитов, могут стимулировать процессы репарации и тем самым ускорять заживление хронических ран.

Целью данного этапа работы была оценка эффективности добавления к стандартному лечению язвенных дефектов собственной плазмы пациента, обогащенной тромбоцитами.

Дизайн: открытое, рандомизированное контролируемое исследование. Пациенты были рандомизированы случайным образом в соотношении 1:1 на получающих стандартную терапию в сочетании с аутоплазмой, обогащенной тромбоцитами (группа 1- группа вмешательства) или только стандартную терапию (группа 2 - стандартное лечение).

Все пациенты, включенные в исследование, обратились за амбулаторной помощью в отделение диабетической стопы ГБУЗ "Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы" по поводу длительно незаживающих язвенных дефектов стоп.

Критерии включения в исследование

- язвенные дефекты у больных сахарным диабетом 1 или 2 типа, расположенные ниже голеностопного сустава;
- возраст старше 18 лет;
- уменьшение площади раны менее чем на 50% за 4 недели лечебных процедур;
- отсутствие признаков системного или местного инфекционного воспаления;
- лодыжечно-плечевой индекс на тиббиальных артериях пораженной конечности $\geq 0,9$
- уровень HbA1c $\leq 9\%$
- желание и возможность соблюдать рекомендации врача;
- подписанное информированное согласие.

Критерии не включения в исследование

- язвенные дефекты расположенные выше голеностопного сустава;
- язвенные дефекты, расположенные в межпальцевых промежутках;
- клинические признаки системного или местного инфекционного воспаления : наличие двух и более признаков: локальная гипертермия, гиперемия и отек окружающих тканей, отделяемое гнойного характера, боль в области раны пульсирующего характера, неприятный запах из раны, системное повышение температуры, лимфангит;
- лодыжечно-плечевой индекс на тиббиальных артериях пораженной конечности $< 0,9$
- критическая ишемия пораженной конечности: наличие у пациента постоянной боли, требующей регулярного обезболивания в течение 2 недель и более, наличие нарушений целостности кожных покровов в пределах стоп, связанных с одним или несколькими измененными параметрами

гемодинамики: ЛПИ $< 0,4$; систолическим АД на тибиальных артериях < 50 мм.рт.ст.

-невозможность или нежелание пациента соблюдать рекомендации врача.

Лечебные процедуры

Все пациенты получали помощь в амбулаторных условиях, согласно российским и международным стандартам оказания помощи пациентам с синдромом диабетической стопы (таблица 42).

Таблица 42. Основные компоненты оказания стандартной помощи больным с синдромом диабетической стопы.

- оценка состояния раны и окружающих тканей
- назначение режима разгрузки : индивидуальная разгружающая повязка в съемной варианте
- обработка раны : удаление окружающего гиперкератоза, удаление некротических масс промывание раствором жидкого антисептика (0.05% раствор хлоргексидина),
- назначение раневого покрытия в зависимости от уровня экссудата
- назначение антибактериальных препаратов при наличии показаний
- оценка состояния магистрального кровотока: консультация сосудистого хирурга при наличии показаний
- оценка состояния уровня гликемии
- оценка состояния сопутствующей патологии: консультации смежных специалистов при наличии показаний
- динамическое наблюдение за состоянием раны

Пациентам, рандомизированным в интервенционную группу, в дополнении к стандартному лечению наносился гель с плазмой, обогащенной тромбоцитами, 1 раз в неделю.

Методика получения собственной плазмы, обогащенной тромбоцитами.

Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы была использована технология испанского Института биотехнологий (БИ)- PRGF-Endoret. Система для получения обогащенной тромбоцитами плазмы состоит из центрифуги, нагревательного блока, стерильных пробирок, аксессуаров для забора крови, мерной пипетки. В зависимости от размера раны у пациента забиралась венозная кровь с количеством 10-20 мл в пробирки объемом 9 мл, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8% цитрата натрия, не активирующего тромбоциты. Затем кровь пациента центрифугировалась с ускорением 580 g в течение 8 минут. Заданные параметры центрифугирования приводят к разделению цельной крови на фракции: слой эритроцитов (нижний), слой лейкоцитов (средний), плазма (верхний слой). В свою очередь полученная плазма состоит из слоев с небольшим содержанием тромбоцитов - верхний слой и обогащенный тромбоцитами - нижний слой. При помощи микропипеток производилась аспирация бедного и обогащенного слоев в отдельные стерильные пробирки. Для дегрануляции α -гранул тромбоцитов использовался 10% раствор хлорида кальция из расчета 50 μ l на 1 мл плазмы. Активированная плазма помещалась в стерильные стеклянные чашки для последующей термостатной обработки. Инкубация плазмы в термостате проводилась при температуре 37⁰C в течение 40 минут. В результате образовывался аутогенный фибрин, содержащий различные факторы роста. Конечный продукт имел вид плотного желе, которое и накладывалось на рану. Сверху на гель накладывалось раневое покрытие "Атравман" ("Хартман", Германия) и фиксировалось вторичным покрытием с клеевой основой ("Мепор", Швеция).

Протокол исследования.

После подписания информированного согласия пациентам назначались еженедельные визиты в течение 4-х недель вводного периода. После окончания вводного периода проводилась оценка критериев включения и не включения в исследование, а затем рандомизация с использованием компьютерной программы. Пациентам группы вмешательства назначались аппликации плазмы, обогащенной тромбоцитами в течение 8 недель или меньше, если заживление раны происходило раньше (Таблица 43).

Таблица 43. Визиты пациентов в отделение диабетической стопы согласно протоколу исследования.

Процедуры, выполняемые в ходе визитов	Недели исследования		
	Вводный период: -4 - 0	Период вмешательства: 0 - 8	Наблюдение: 8 - 20
Подписание информированного согласия	+		
Оценка критериев включения и не включения	+		
Взятие крови для приготовления аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами	+		
Обработка раны	+	+	+
Оценка размеров раны	+	+	+
Побочные эффекты		+	+
Оценка состояния	+	+	+

углеводного обмена			
Оценка состояния сопутствующих заболеваний	+	+	+

Оценка эффективности.

Первичная конечная точка - оценка эффективности применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами по количеству язвенных дефектов, заживших за 20 недель в обеих группах. Заживлением считалась полная эпителизация язвенного дефекта без рецидивов в течение 4-х недель.

Вторичные конечные точки были разделены на относящиеся непосредственно к язвенному дефекту и относящиеся к пациенту.

Исходы, относящиеся к язвенному дефекту:

- время заживления в днях;
- количество заживших язвенных дефектов за 12 и 26 недель;
- изменение размеров раны за 8, 12, 20, 26 недель;
- количестве язвенных дефектов с признаками вторичного инфицирования.

Исходы, относящиеся к пациенту:

- количество высоких ампутаций за период исследования и наблюдения;
- количество малых ампутаций за период исследования и наблюдения.

Результаты

В исследовании приняли участие 80 пациентов. Обе группы были сопоставимы по базовым клиническим характеристикам (Таблица 44). Среди участников были преимущественно пациенты с СД 2 типа в возрасте 58 ± 8 лет. Мужчин было большинство (59%). Средняя продолжительность СД составила $13,7 \pm 9,3$ лет; средний уровень HbA1c $-8,2 \pm 1,7$ (%). Язвенные

дефекты сопровождались выраженным снижением периферической чувствительности: средний уровень НДС составил 14 ± 5 баллов, 63 % пациентов не ощущали вибрацию камертона. Все язвенные дефекты захватывали кожу и подкожную клетчатку, что соответствовало II степени по классификации Вагнера. Большинство ран располагалась плантарно (73%), меньшая часть на тыльной поверхности стопы (27%). В 32% случаях язвенные дефекты были результатом предшествующего хирургического вмешательства, в большинстве остальных случаев (68%) причиной ран были механические травмы.

Таблица 44. Клиническая характеристика пациентов с СДС

Параметр	Группа 1 (аутоплазма, обогащенная тромбоцитами) n=39	Группа 2 (стандартное лечение) n=41	Все пациенты n=80	p
Средний возраст пациентов, годы	$60,4 \pm 10$	$58,6 \pm 8,9$	$59,46 \pm 8,2$	0,09
Пол (М/Ж, %)	59 /41	70/30	65/35	0,36
СД 1/2 (%)	5 / 95	16/84	11/89	0,16
Продолжительность СД, годы	$13,2 \pm 9$	$14,5 \pm 10$	$13,7 \pm 9,3$	0,6
HbA1c (%)	$8,4 \pm 2$	$8,1 \pm 1,5$	$8,2 \pm 1,7$	0,09
НДС, баллы ($m \pm SD$)	$14 \pm 4,9$	$13,7 \pm 4,3$	$13,9 \pm 4,6$	0,95
Количество пациентов, не чувствующих вибрацию камертона (n, %).	25 (64%)	27 (63%)	51 (63%)	0,87
Количество больных с ХБП С5	6 (15%)	8 (17%)	14 (17%)	0,19
Количество больных с	8 (21%)	12 (28%)	20 (24%)	0,94

пролиферативной стадией диабетической ретинопатии				
Длительность существования язвенного дефекта (дни)*				
≤ 30	12 (30,8 %)	17 (39,5%)	29 (35,4%)	0,13
31- 90	9 (23,1 %)	14 (32,6%)	23 (28%)	
91-180	3 (7,7 %)	6 (14%)	9 (11%)	
181-365	5 (12,8%)	1 (2,3%)	6 (7,3%)	
> 365	10 (25,6%)	5 (11,6%)	15 (18,3%)	
Локализация язвенного дефекта				
плантарная	28 (72 %)	32 (74%)	60 (73%)	0,79
не плантарная	11 (28%)	11 (26%)	22 (27%)	
Причина возникновения язвенного дефекта				
после операции	12 (31%)	14 (33%)	26 (32%)	0,86
любая другая (травма, потертость)	27 (69%)	29 (67%)	56 (68%)	
Площадь язвенного дефекта				
< 1 см ²	10 (26,3 %)	11 (25,6%)	21 (25,6%)	0,79
1-3 см ²	10 (26,3%)	13 (30,2%)	22 (26,8%)	
> 3 см ²	19 (47,4)	19 (44,2)	38 (46,3%)	

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$) и как абсолютное число и его процентное выражение (n, %).

Перед тем, как включить пациента в исследование, назначались лечебные процедуры по лечению язвенного дефекта (режим разгрузки, местная обработка раны, антибактериальная терапия при наличии показаний). Через 4 недели терапии в зависимости от площади сокращения размеров поражения язвенные дефекты были стратифицированы на следующие подгруппы: 30-45%; 10-29%; < 10%. Пациенты со скоростью сокращения площади язвенного дефекта <10 % отличались достоверно более

длительным сроком существования до обращения за специализированной помощью, были значимо реже результатом оперативного вмешательства (таблица 45).

Таблица 45. Клиническая характеристика пациентов с синдромом диабетической стопы с разной скоростью сокращения площади поражения за 4 недели лечения

Параметр	Сокращение площади поражения			p
	30-49% n = 28	10-29% n= 21	< 10% n = 31	
Средний возраст пациентов, годы	57,6 ± 6,8	55,4 ± 9,6	60,5 ± 7,5	0,07
Пол (n, %)				
М	21 (75%)	13 (62%)	18 (56%)	0,3
Ж	7 (25%)	8 (38%)	14 (44%)	
СД (n, %)				
1	3 (11)	2 (10)	4 (13)	0,94
2	25 (89)	19 (90)	28 (87)	
Продолжительность СД, годы	13,2 ± 9	14,5 ± 10	13,7 ± 9,3	0,6
HbA1c, %	8,4 ± 1,7	8,2 ± 1,9	8,1 ± 1,8	0,9
Длительность существования раны до обращения за специализированной помощью, дни	96,6 ± 318,6	189,9 ± 321,4	418,6 ± 594,2	0,02*
Локализация				
Плантарная	16 (57%)	17 (81%)	26 (81%)	0,07
Не плантарная	12 (43%)	4 (19%)	16 (29%)	
Причина возникновения				
После операции	14 (50%)	6 (29%)	6 (19%)	0,03
Любая травма	14 (50%)	16 (71%)	26 (81%)	

Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($m \pm SD$), как целое число с процентным соотношением (n,%).

*Разница достоверна для групп 1 и 3.

Достоверной разницы в количестве пациентов с разной скоростью сокращения площади поражения за 4 недели лечения между группами, получающими стандартное лечение или аппликации плазмы, обогащенной собственными факторами роста не было.

Таблица 46. Распределение язвенных дефектов в зависимости от скорости сокращения размеров за 4 недели

Скорость сокращения	Группа 1 (стандартное лечение) n=39	Группа 2 (аутоплазма, обогащенная тромбоцитами) n=41	p
30-49%	13 (33,3%)	15 (34,9%)	0,26
10-29%	8 (20,5%)	14 (32,6%)	
> 10%	18 (46,2%)	14 (32,6%)	

Данные представлены как целое число с процентным соотношением (n,%).

Согласно полученным результатам количество заживших язвенных дефектов за период наблюдения было сопоставимо в обеих группах. Количество заживших язвенных дефектов и сроки заживления не отличалось в обеих группах (Таблица 47).

Таблица 47. Результаты применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в местном лечении язвенных дефектов у больных с синдромом диабетической стопы.

Параметр	Группа 1 (аутоплазма, обогащенная тромбоцитами) n=39	Группа 2 (стандартное лечение) n=41	p
Первичная конечная точка			
Количество заживших язвенных дефектов за	21 (53,8%)	28 (65,1%)	0,3

период наблюдения			
Вторичные конечные точки			
Количество язвенных дефектов, заживших за 12 недель	3 (14,3%)	6 (21,4%)	0,4
Количество язвенных дефектов, заживших за 24 недели	9 (42,9%)	13 (46,4%)	0,5
Количество язвенных дефектов, заживших за год	4 (19%)	5 (18%)	0,6
Среднее количество дней до заживления	176 [102; 375]	133 [91; 234]	0,7

Данные медиана и 25%и 75;% квартили (Ме [25%; 75%], как целое число с процентным соотношением (n,%)).

Для определения влияния скорости сокращения размеров раны на заживление язвенных дефектов был проведен сравнительный анализ заживших и не заживших язвенных дефектов в обеих группах: аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, и стандартного лечения в зависимости от показателей скорости снижения раны за 4 недели лечения (таблица 48).

Таблица 48. Сравнительный анализ заживших и не заживших язвенных дефектов в зависимости от площади сокращения размеров раны за 4 недели до рандомизации.

Скорость сокращения раны за 4 недели	Группа 1 (аутоплазма, обогащенная тромбоцитами) n=39		Группа 2 (стандартное лечение) n=41		p
	зажившие	не зажившие	зажившие	не зажившие	
30-49%	11 (79%)	3 (21 %)	15 (100%)	0	0,45
10-29%	7 (100%)	0	12 (86%)	2 (14%)	0,35

< 10%	4 (22%)	14 (78%)	1 (8%)	11 (92%)	0,09
-------	---------	----------	--------	----------	------

Данные представлены как целое число с процентным соотношением (n,%).

По полученным данным язвенные дефекты, площадь сокращения размеров которых была менее 10% за 4 недели лечебных мероприятий не зажили за весь период наблюдения в обеих группах. Больше количество заживших язвенных дефектов отмечено в группе пациентов с язвенными дефектами площадь сокращения, которых была выше 30% за 4 недели наблюдения вне зависимости от того, какой вид лечения получали пациенты.

За время наблюдения ампутаций в пределах стопы и выше голеностопного сустава не было в обеих группах. Количество инфицированных язвенных дефектов было сопоставимым в обеих группах (таблица 49)

Таблица 49. Осложнения течения заживления язвенных дефектов в группе пациентов, получающих стандартное (группа 1) и лечение аутоплазмой, обогащенной тромбоцитами (группа 2).

Осложнение	Группа 1 (аутоплазма, обогащенная тромбоцитами) n=39	Группа 2 (стандартное лечение) n=41	p
Инфицирование раны	3 (7,7%)	7 (16,3%)	0,24
Ампутации в пределах стопы	0	0	
Ампутации выше голеностопного сустава	0	0	

Данные представлены как абсолютное число и процентное соотношение (n,%).

Обсуждение полученных результатов.

Проблема длительных сроков заживления хронических ран инициирует поиск средств, способных воздействовать на репаративные процессы с целью ускорения их эпителизации. В проведенном исследовании был введен дополнительный параметр оценки эффективности терапии - это скорость

сокращения площади раневых дефектов за 4 недели назначения консервативного лечения. Язвенные дефекты были разделены на три группы: 1- с условно высокой скоростью сокращения размеров (30-49%), 2- с умеренной (10-29%), 3 - с низкой (< 10%). В качестве адьювантного средства были использованы аппликации аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами. Первичной конечной точкой было выбрано количество заживших ран в обеих группах. По этому показателю, а также по количеству ран, заживших за 3 месяца, полгода и год не получено данных о преимуществе данного вида лечения перед стандартной терапией. Однако, в процессе анализа были получены данные о разном ответе язвенных дефектов как на аппликации аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, так и стандартную терапию. Наилучшие результаты были получены в группах пациентов с условно высокой скоростью сокращения размеров за 4 недели. В этих группах наступило заживление язвенных дефектов в 79% и 100% случаев соответственно. Напротив, большинство язвенных дефектов с условно низкой скоростью сокращения размеров за 4 недели не зажили за период наблюдения. В этой связи можно сделать заключение о нецелесообразности терапевтических лечебных мероприятий, включая применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, у пациентов с язвенными дефектами, скорость сокращения которых ниже 10% за 4 недели лечебных мероприятий. Таких пациентов необходимо консультировать с хирургами (ортопедами или пластическими) в рамках междисциплинарного взаимодействия.

Таким образом, в проведенном рандомизированном контролируемом исследовании данных о преимуществе добавления аппликаций аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами к стандартной терапии перед стандартной терапией по нашим данным не получено.

4.2 Применение эпидермального фактора роста в комплексном лечении больных с синдромом диабетической стопы в амбулаторной практике.

Основываясь на данных об эффективности ЭФР в лечении хронических ран при СДС, в трех медицинских учреждениях Москвы было проведено проспективное, открытое, многоцентровое, предрегистрационное клиническое исследование по оценке эффективности и безопасности лекарственного препарата Эберпрот-П® (эпидермальный фактор роста человеческий рекомбинантный), применяемого для терапии язв стоп у пациентов с сахарным диабетом (протокол № Е-2011/01- RU). ЭФР использовался в виде лекарственного препарата Эберпрот- П® (произведен Центром Генной Инженерии и Биотехнологии, Республика Куба, РУ № ЛП-002375 от 17.02.2014 г.). Эберпрот-П® представляет собой лиофилизированный порошок, содержащий 75 мкг рекомбинантного человеческого ЭФР. Основной первичной задачей исследования была оценка влияния препарата на формирование грануляционной ткани в трофических язвах стоп у пациентов с СД. Полным ответом на терапию считалось формирование грануляционной ткани, покрывающей > 75% всей площади язвенного дефекта.

В данном разделе представлены результаты субанализа эффективности применения препарата Эберпрот-П® в комплексном лечении больных с СДС, получающих лечение в амбулаторном режиме.

Критерии включения пациентов в исследование:

- пациенты с СД 1 или 2 типов старше 18 лет;
- наличие глубокой язвы площадью $\geq 1 \text{ см}^2$;
- отсутствие видимых клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса;

- отсутствие критической ишемии;
- лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) $\geq 0,6$, но $\leq 1,3$ или плече-пальцевой индекс (ППИ) $\geq 0,5$.
- наличие подписанного письменного информированного согласия.

Критерии не включения пациентов в исследование:

- площадь язвы $< 1 \text{ см}^2$;
- гликированный гемоглобин HbA1c $\geq 11\%$;
- наличие рентгенологических признаков остеомиелита;
- стопа Шарко;
- показатель транскутанной оксиметрии $< 30 \text{ мм.рт.ст.}$;
- гемоглобин $< 100 \text{ г/л}$;
- злокачественное новообразование;
- инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, сердечная недостаточность, IV функциональный класс;
- хроническая почечная недостаточность;
- любое другое заболевание, способное по мнению исследователя, повлиять на участие в исследовании.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- желание пациента прекратить проводимую терапию;
- не соблюдение пациентом рекомендаций врача;
- образование грануляционной ткани, покрывающей 100% площади язвы;
- закрытие язвенного дефекта пересаженным лоскутом;
- выходящее за границу язвенного дефекта избыточное образование грануляционной ткани;
- неудовлетворительный терапевтический эффект: увеличение площади язвенного дефекта $> 25\%$ по сравнению с исходными параметрами после 4 недель терапии, либо необходимость ампутации нижней конечности;

- пропуск 10 и более инъекций исследуемого препарата;
- нежелательное явление, потребовавшее, по мнению исследователя, прекратить терапию исследуемым препаратом;
- положительный тест на беременность у женщин;
- пациент получил или нуждается в дополнительном лечении, которое могло повлиять на эффективность и безопасность исследуемого препарата.

Цели исследования.

Первичная конечная точка.

Доля пациентов, у которых к концу исследования отмечен полный ответ на терапию, т.е. формирование грануляционной ткани, покрывающей > 75% всей площади язвы.

Вторичные конечные точки:

1. Полное заживление язвенных дефектов при СДС на фоне лечения Эберпротом - П®.
2. Частота ампутаций нижних конечностей у пациентов с язвенными дефектами при СДС, получавших терапию Эберпротом - П®.
3. Безопасность применения Эберпрота - П® при лечении язвенных дефектов у больных с СДС.

Для расчета площади ран и грануляций в ране использовался прибор «Визитрак» («Smith&Nephew», Великобритания). Контуры раны и грануляций в ране наносились на специальное покрытие «Опсайт Флексигрид» («Smith&Nephew», Великобритания). После этого покрытие с контурами помещалось в «Визитрак» и производилось определение площади (Рисунок 26).

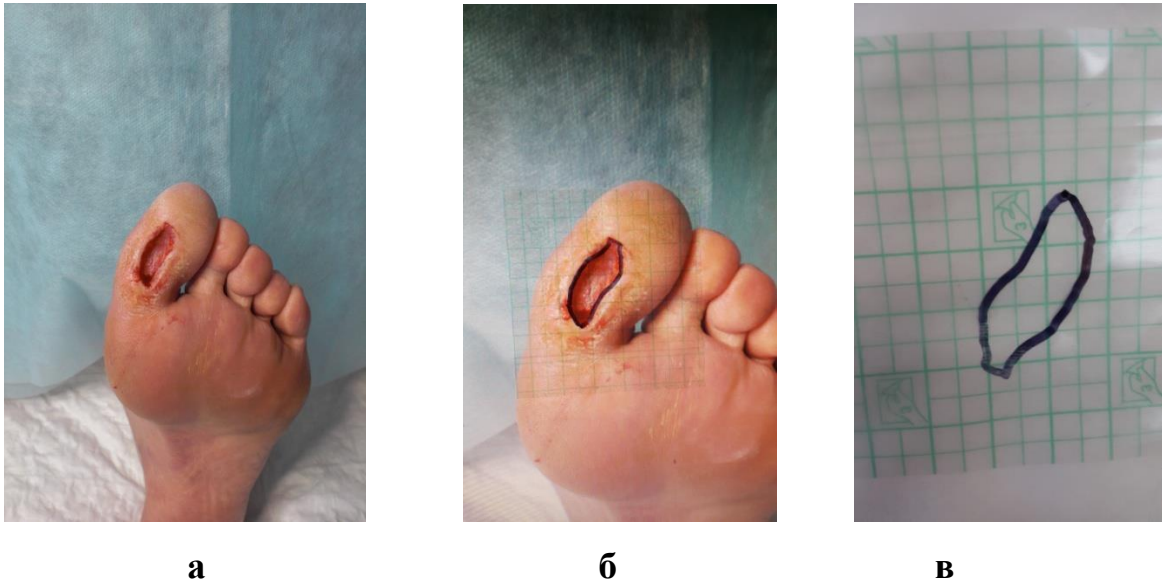


Рисунок 26. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма . Язвенный дефект подошвенной поверхности 1 пальца левой стопы II степени по Вагнеру. а- фото язвенного дефекта; б- перенос размера раны на пленку «Опсайт Флексигрид»; в- площадь раны на пленке «Опсайт Флексигрид».

Методика применения Эберпрота- П®.

Эберпрот- П® назначался в качестве дополнительного метода лечения к обязательным стандартным подходам при лечении нейропатической формы синдрома СДС, включая соблюдение режима разгрузки пораженной конечности, контроль инфекции, местное очищение раны. Для обеспечения адекватного режима разгрузки все больные были снабжены разгружающей обувью.

Эберпрот- П® вводился в область дна и краев язвенного дефекта в дозировке 0,075 мг. Если у пациента было более одной трофической язвы, то только одна из них подвергалась лечению Эберпротом- П® и оценивалась в течение исследования. Ниже перечислены правила применения Эберпрота- П®:

- перед инъекцией врач должен тщательно вымыть руки и одеть стерильные перчатки;

- при необходимости выполняется местная анестезия области язвенного дефекта;

- перед инъекцией язвенный дефект должен быть тщательно промыт физиологическим раствором, некротические ткани и окружающий рану гиперкератоз удалены;

- перед выполнением внутритканевых инъекций лиофилизат разводился водой для инъекций в объеме 5 мл. Этот объем необходимо распределить на 5-10 инъекций;

- инъекции необходимо выполнять в глубину тканей, в область мягких тканей дна язвы и в края раны;

- для введения препарата в дно язвы использовались иглы для инъекций 24Gx1^{1/2} ("Бектон Дикинсон", Ирландия), для введения в края раны 26Gx1^{1/2} ("Бектон Дикинсон", Ирландия). Смена иглы проводилась при выполнении каждой инъекции!

- после выполнения инъекций язвенный дефект покрывался раневым покрытием "Атравман" ("Пауль Хартман", Германия) и фиксировался бинтом.

Длительность терапии.

Препарат вводился три раза в неделю в течении 8 недель (22 визита). Расписание визитов и процедур исследования отражены в Таблице 50.

Таблица 50. Расписание визитов и процедур исследования.

Визит	Скрининг	Введение препарата визиты: 1-24	Наблюдение 1,4,7,10,13,16,19,22	Заключительный визит
Информированное согласие	+			
Присвоение	+			

идентификационного номера				
Демографические данные	+			
Анамнез заболевания	+			
Сопутствующие заболевания	+			
Сопутствующая терапия	+			+
Критерии включения/невключения	+			
Физикальное обследование	+			+
Оценка общего состояния, АД, ЧСС, t тела до введения препарата	+	+	+	+
Оценка состояния раны, включая определение площади, глубины, % грануляций			+	+

Результаты.

По способу оказания помощи пациенты (n = 39) были разделены на 2 группы: 26 пациентов лечились в условиях стационара с последующим амбулаторным ведением, 13 пациентов получали помощь только в амбулаторных условиях. Дополнительный анализ проводился только в группе пациентов, получающих амбулаторное лечение в отделении

диабетической стопы ГБУЗ "Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы".

В таблице 51 дана клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование.

Таблица 51. Клиническая характеристика пациентов.

Параметр	Значение (n=13)
Возраст, годы	56,2 ± 7,6
Пол (м/ж,%)	55/54
СД 1/2 (%)	23/77
HbA1c, %	8,2 ± 1,3
Нейро-ишемические язвенные дефекты, n (%)	1 (8%)
Нейропатические язвенные дефекты, n (%)	38 (92%)

HbA1c- гликированный гемоглобин. Данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($m \pm SD$), как целое число с процентным соотношением (n,%).

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($m \pm SD$), абсолютное число (n), абсолютное число и процентное соотношение (n,%).

Средний возраст пациентов, получавших помощь в амбулаторном режиме, был 56,2 ± 7,6 лет, в большинстве случаев у них был СД 2 типа и нейропатические язвенные дефекты. В таблице 52 представлена общая характеристика раневых дефектов пациентов.

Таблица 52. Общая характеристика раневых дефектов.

Параметр	Значение (n=13)
Длительность наличия ран до начала лечения, дни	39 ± 107
Глубина ран, мм	10,1 ± 8,8

Площадь ран, см ²	2,0 ± 1,0
------------------------------	-----------

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (m±SD)

Таким образом, язвенные дефекты у пациентов, включенных в исследование существовали больше года, были небольшого размера и глубины. В Таблице 53 приведены данные динамики формирования грануляционной ткани.

Таблица 53. Динамика формирования грануляционной ткани у пациентов, получающих лечение препаратом Эберпрот-П в амбулаторной практике

% грануляционной ткани		p
Визит 0	Заключительный визит	
76,3 ± 4,5	78,5 ± 3,6	0,5

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (m±SD)

Согласно полученным данным, в группе больных, получающих помощь амбулаторно, прироста грануляций не отмечено.

Больным из группы амбулаторного ведения понадобилось проведение всех визитов. При этом, изменение площади ран было выражено незначительно (Рисунок 27). За время наблюдения эпителизация не наступила ни в одном случае.

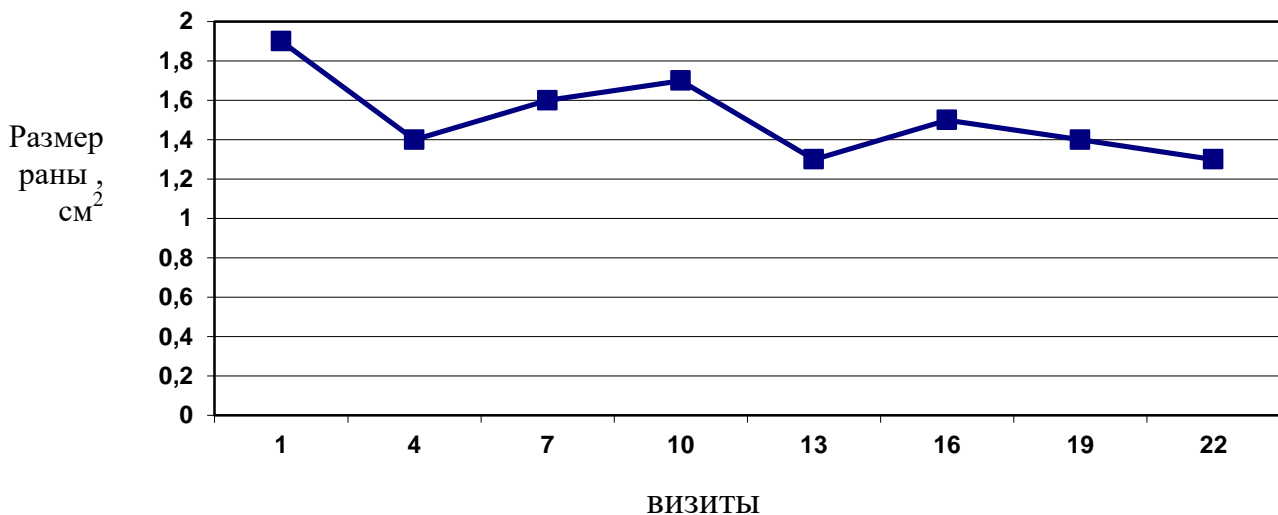


Рисунок 27. Динамика линейных размеров ран в процессе лечения.

Побочные эффекты.

Наиболее частыми побочными реакциями на введение препарата были: озноб с повышением температуры тела (21%), инфицирование раны (18%), боль и жжение в области инъекций (15%). Это соответствует имеющимся в литературе данным о нежелательных явлениях при использовании Эберпрота-П (15). В отличие от инфицирования раны и болевых ощущений в области введения лекарственного препарата, которые носят локальный характер, озноб с повышением температуры свидетельствует о его системном действии. В одном случае наблюдалось повышение внутриглазного давления у больного с неоваскулярной глаукомой, которая была осложнением пролиферативной ретинопатии. Исследователи не связали данное нежелательное явление с введением ЭФР. Однако, для того, чтобы полностью исключить такую связь, нужны дополнительные исследования и наблюдения. Следует иметь в виду, что препарат поступает в системный кровоток и имеет достаточно времени, чтобы связаться с аффинными рецепторами и запустить каскад нежелательных реакций. Кроме того, есть данные об участии ЭФР в развитии диабетической пролиферативной ретинопатии [185, 186].

Учитывая тот факт, что за время лечения (8 недель) эпителизация не наступила ни в одном случае, было принято решение провести морфологический анализ образцов язвенных дефектов пациентов, принявших участие в исследовании. 10 пациентов дали свое согласие на проведение исследования (Методика выполнения подробно изложена в Главе 2).

Морфологический анализ включал в себя:

- гистологический анализ образцов с подсчетом процентного соотношения грануляционной ткани, некроза, фиброза в ранах, вычислением КР
- оценки пролиферативной активности грануляционной ткани с определением маркера пролиферации ядерного белка Ki67;

- определения экспрессии эпидермального фактора роста (ЭФР) и рецепторов к нему.

Результаты морфологического исследования образцов отражены в таблице 54.

Таблица 54. Результаты морфометрии образцов язвенных дефектов пациентов, получавших лечение препаратом Эберпрот- П® в амбулаторном режиме

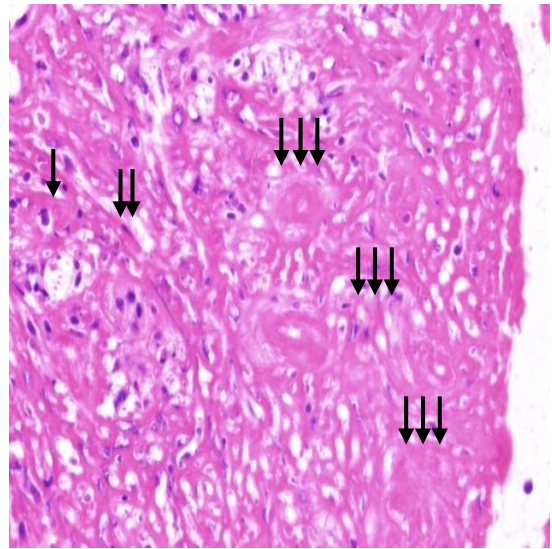
Количество образцов	10
Относительное содержание грануляционной ткани (%)	33 ± 17
Относительное содержание некроза (%)	13 ± 6
Относительное содержание фиброзной ткани (%)	54 ± 16
КР	0,49 ± 0,77

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (m±SD).

Как представлено в таблице, КР в ранах был ниже 1,0, что указывает на низкую способность к репарации. Следует отметить, что средние значения содержания грануляционной ткани в образцах, полученные в результате морфологического исследования и субъективной оценки исследователя, отличаются более, чем в два раза (Рисунок 28).



а



б

Рисунок 28. Макро и микропрепараты язвенного дефекта подошвенной поверхности правой стопы II степени по Вагнеру:

-а- макропрепарат. Содержание грануляционной ткани по субъективной оценке исследователя составило 80%;

-б- микропрепарат (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$). Условные обозначения: ↓- участки некроза (Н), ↓↓ - грануляции (Г), ↓↓↓ - фиброз (Ф). По результатам морфометрии в язвенном дефекте выявлено 40% грануляционной ткани, 50% фиброза, и 10% некротических тканей.

В таблице 55 представлены результаты иммуногистохимического анализа образцов.

Таблица 55. Экспрессия Ki67, эпидермального фактора роста (ЭФР) и рецепторов к нему (ЭФР_p)

Количество образцов	10
Ki 67 (%)	4,88 ± 4,45
ЭФР (%)	0,25 ± 0,71
ЭФР _p (%)	0

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($m \pm SD$).

Таким образом, согласно полученным данным репаративная активность грануляционной ткани в язвенных дефектах после введения препарата Эберпрот- П® в амбулаторных условиях была на крайне низких значениях, при этом рецепторов к ЭФР в этих ранах не было, а экспрессия

ЭФР находилась на низком уровне. В литературе есть данные о различной эффективности ЭФР при острых и хронических ранах. Содержание самого ЭФР при острых ранах повышено, тогда как при хронических - снижено [146]. Кроме того, биодоступность ЭФР в хронических ранах при СДС нарушена: фибробласты хронических ран при СДС плохо отвечают на стимуляцию ЭФР [187,188]. Экспрессия рецепторов к ЭФР в острых ранах повышена, а в хронических - снижена как в кератиноцитах, так и в эндотелиальных клетках [189]. Также отмечена дислокация рецепторов из мембраны клеток, в цитоплазму [146]. Вышеуказанные особенности ЭФР в хронических ранах нашли свое проявление в данной работе. После введения препарата репарационный потенциал грануляционной ткани по уровню экспрессии Ki67 находился на крайне низкой степени активности, что реализовалось в отсутствии не только заживления ран, но и в отсутствии сокращения размеров раны. Полученные данные позволяют сделать предположение о нецелесообразности применения препарата Эберпрот-П у больных с длительно незаживающими язвенными дефектами, получающих лечение в амбулаторном режиме

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в клинической диабетологии отмечается рост интереса к проблеме СДС. СДС является поздним осложнением сахарного диабета и представляет инфекцию, язву и/или деструкцию глубоких тканей, связанную с неврологическими нарушениями и снижением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей различной степени тяжести. Несмотря на определенные успехи в вопросах диагностики и лечения, СДС продолжает оставаться основной причиной нетравматических ампутаций нижних конечностей [190, 191]. Кроме того, нельзя не учитывать тот факт, что лечение пациентов с СДС высоко затратно [192, 193]. По этой причине, одной из целей Сент-Винсентской декларации (1989 г.) было снижение количества высоких ампутаций к 2000 г. на 50% [194]. Спустя 10 лет в международном согласительном документе были названы конкретные мероприятия, направленные на снижение количества высоких ампутаций [29]:

- выявление пациентов, имеющих высокий риск образования язвенных дефектов;
- раннее обращение за специализированной помощью;
- разгрузка конечности;
- восстановление кровотока;
- борьба с инфекцией.
- междисциплинарный подход к ведению пациентов.

В настоящее время стратегия ведения больных с язвенными дефектами при СДС базируется на оценке состояния магистрального кровотока, наличия признаков инфекции (местной или общей) и локализации поражения. Контроль вышеуказанных состояний составляет основу лечебных мероприятий при данной патологии как на стационарном, так и на амбулаторном этапах лечения. В отделении диабетической стопы ГБУЗ

«Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы» с 2002 г. применяется междисциплинарный подход к ведению пациентов с СДС. Состав команды представлен следующими постоянными участниками: специалисты по диабетической стопе - эндокринологи и хирург, сосудистый хирург, медицинские сестры. При необходимости лечение пациента проводится совместно с хирургами отделений гнойной хирургии городских клинических больниц с койками по диабетической стопе и ортопедами.

В работе проведено и представлено исследование исходов лечения 503 больных с язвенными дефектами при СДС, получающих специализированную амбулаторную помощь. Проведенный когортный анализ продемонстрировал высокую эффективность специализированной помощи данной категории больным на догоспитальном этапе. Большинство язвенных дефектов у таких пациентов протекает на фоне адекватного магистрального кровотока (67%). Количество высоких ампутаций за исследуемый период (2014 - 2019 гг.) в общей группе составило 1,8%. Основным фактором риска их выполнения было нарушение магистрального кровотока в пораженной конечности. После стратификации группы по состоянию кровотока, количество высоких ампутаций в группе с нейропатическими язвенными дефектами составило 0,3%, а в группе с нейроишемическими поражениями - 8%. Полученные нами показатели сопоставимы с опубликованными в литературе в отношении высоких ампутаций конечностей среди пациентов, получающих помощь в амбулаторном режиме. Так, по данным крупнейшего проспективного многоцентрового исследования EURODIALE доля высоких ампутаций составила 5% среди всех больных с СДС и 8% среди больных с нейроишемической формой СДС [195]. В Ноттингеме (Великобритания) высокие ампутации были выполнены у 5% пациентов с СДС [2], а в когортном исследовании проведенном в Германии - у 3% пациентов [18]. В двух

последних исследованиях стратификации группы по магистральному кровотоку не проводилось. При этом, по нашим данным, риск выполнения высоких ампутаций у пациентов с ишемией конечности возрастает в 3,2 раза с увеличением возраста на каждые 10 лет, в 7,5 раз при увеличении глубины поражения кожных покровов на 1 степень по Вагнеру в 1,7 раз при увеличении уровня HbA1c на 1%. Следует отметить, что данные по влиянию компенсации углеводного обмена на вероятность выполнения высоких ампутаций у пациентов с нейро-ишемической формой СДС получены впервые. Опубликованы результаты исследования с участием пациентов с СД 1 типа без уточнения состояния магистрального кровотока, где относительный риск выполнения высоких ампутаций повышался в 1,68 раз при увеличении HbA1c на 1% [196]. Так же, есть указания на то, что при уровне HbA1c > 7%, относительный риск выполнения ампутаций на любом уровне увеличивается вдвое [197]. Учитывая, что снижение сахара крови до целевых значений относится к модифицируемым параметрам, нормализацию углеводного обмена можно рассматривать как важнейший компонент снижения количества высоких ампутаций у пациентов с СД и нарушением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей.

Заживление без выполнения высоких и малых ампутаций в общей когорте пациентов с СДС достигнуто в 406 случаев (80,7 %). Полученные данные о количестве заживших в течение года ран сопоставимы с опубликованными показателями ряда европейских клиник. Так, в исследовании EURODIALE заживления язвенных дефектов при СДС удалось достичь в 77% [63]. По данным проспективного исследования немецких коллег частота заживления язвенных дефектов при СДС составила 57% при осложненных формах СДС, включая снижение кровотока в пораженной конечности, инфекцию, остеомиелит и до 93% при неосложненных формах. Следует отметить, что в этом исследовании не указаны сроки, при которых был достигнут вышеуказанный результат. При

этом, процент высоких ампутаций составил 3% в общей группе больных с СДС [18].

Значимыми предикторами отсутствия заживления в результате консервативных мероприятий в течение года явились: нарушенный магистральный кровоток и несвоевременное обращения за специализированной медицинской помощью. При стратификации когорты по состоянию магистрального кровотока предиктором отсутствия заживления было несвоевременное обращение за специализированной медицинской помощью и размер поражения более 1 см² при нейропатической форме СДС. Не выявлено доказательств влияния на исход демографических (возраст, пол) и клинических (тип СД, HbA1c, локализация язвенного дефекта, его глубина, инфицирование при первичном обращении) параметров. Полученные данные отличаются от опубликованных результатов когортных исследований. Так, в исследовании EURODIALE предикторами отсутствия заживления в общей группе пациентов с СДС были возраст, мужской пол, сердечная недостаточность, терминальная стадия хронической болезни почек, большой размер язвенного дефекта, нарушение магистрального кровотока, периферическая нейропатия. Параметром определяющим отсутствие заживления у больных с нарушенным магистральным кровотоком была инфекция [63]. В нашей работе влияния инфекции на исход течения язвенного дефекта в течение года не получено. Одним из возможных объяснений этого является обязательное назначение антибактериальных препаратов при наличии признаков инфицирования при первичном обращении, адекватная хирургическая обработка раны и более частые визиты (2-3 раза в неделю) в отделение для выполнения ухода за раной.

Проблема сроков заживления язвенных дефектов при СДС является достаточно актуальной для практического здравоохранения. Период лечения хронических ран, к которым относятся язвенные дефекты при СДС, может

длиться от 3-х месяцев до нескольких лет. В этой связи, выявление факторов, замедляющих заживление или, напротив, ускоряющих его, представляет несомненный интерес для клиницистов. Следует отметить, что точно установленного срока, в течение которого хроническая рана при СДС должна эпителизироваться, не существует. Единого мнения в экспертном сообществе по ориентировочным срокам тоже нет. При анализе данных когортных исследований в качестве конечных точек изучается количество язвенных дефектов заживших за 12 недель (3 месяца или 90 дней) [134, 135, 198]. В этой связи, можно рассматривать 12 недель в качестве минимального срока для заживления язвенного дефекта при СДС. При этом хорошим прогностическим признаком заживления в условно оптимальные сроки считается скорость сокращения раны за 4 недели лечебных мероприятий более чем на 50% от первоначального размера [6,199]. По полученным нами данным, средние сроки заживления в общей когорте составили 134 дня (93; 178). В 49% случаев эпителизация наступает в течение 3-х месяцев; в 46,4 % случаев- за 12 месяцев; не заживают за 12 месяцев и более- 4,6% язвенных дефектов. Для сравнения, в Ноттингеме (Великобритания) за 6 и 12 месяцев заживление наступает в 55% и в 66% случаев соответственно [2]. По данным амбулаторного кабинета диабетической стопы в ЮЗАО г. Москвы за 3, 6 и 12 месяцев заживление наступило у 34%, 51% и 65% пациентов соответственно [4]. Для нейропатических язвенных дефектов на сроки заживления оказывают влияние длительность существования раны до обращения за специализированной медицинской помощью ($p=0,0132$), размер раны до 1 см² ($p=0,04$), глубина поражения по классификации Вагнера ($p=0,0001$). Для нейроишемических значимое влияние оказывает только глубина поражения по классификации Вагнера (0,0001).

Таким образом, восстановление магистрального кровотока в пораженной конечности, контроль инфекции и соблюдения режима разгрузки приводят к минимизации количества высоких ампутаций и

заживлению язвенных дефектов в подавляющем большинстве случаев. Однако, следует отметить, что в 46,4% случаев язвенные дефекты не заживают в условно оптимальные сроки (3 месяца), а 4,6 % ран не заживают за год и более. При этом, язвенные дефекты, не зажившие за год, были сопоставимы по состоянию магистрального кровотока. С учетом того, что персонализация терапии идет в соответствии со степенью нарушения магистрального кровотока и инфицированности язвенного дефекта, раны разной длительности, размера и глубины лечатся одинаково. Между тем, именно эти параметры были выявлены как значимые в отношении не только заживления, но и его сроков.

В этой связи, для решения вопроса о лечении длительно незаживающих хронических язвенных дефектов (без признаков инфекции на фоне адекватного магистрального кровотока в пораженной конечности) предложена новая концепция персонализации лечебной тактики, основанная на морфологических особенностях раневых дефектов.

По полученным нами данным, заживление хронической раны и его скорость зависят от ее репарационного потенциала, пролиферативной активности грануляционной ткани, определяемой по уровню экспрессии ядерного белка Ki67 и наличия в ране клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток (CD 34, ALDH). В процессе исследования было идентифицировано два вида морфологических фенотипов (МФ) ран, различающихся по указанным параметрам: МФ 1 вида характеризуется высоким репарационным потенциалом [коэффициент репарации (КР) - $2,29 \pm 3,04$], высокой пролиферативной активностью грануляционной ткани по уровню экспрессии Ki67 [18 ± 6 (%)], наличию в ране клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток. При МФ 2 вида отмечены низкие показатели репарационного потенциала ран (КР: $0,95 \pm 1,78$) и пролиферативной активности грануляционной ткани по уровню экспрессии Ki67 [4 ± 5 (%)], отсутствию или крайне низкому содержанию в образцах

клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток. Кроме того, МФ 1 и 2 видов различались по уровню экспрессии факторов роста и рецепторов к ним. В образцах с МФ 2 вида экспрессия факторов роста и рецепторов к ним отсутствует, либо находится в следовых количествах. Тогда как в образцах с МФ 1 вида их экспрессия значимо выше. При этом, различий в клинических параметрах при разных МФ, относящихся к характеристикам пациента, таких как возраст, пол, тип СД, уровень его контроля, наличие и степень тяжести поздних осложнений СД не выявлено. Так же нет различий между МФ по таким характеристикам язвенного дефекта как локализация и размер хронической раны. Достоверные различия между образцами ран, принадлежащих к разным МФ, выявлены по длительности существования раны до обращения за специализированной помощью [33 (10; 67) vs 98 (5; 378) дней, $p=0,0001$], скорости сокращения площади раны за 4 недели лечебных процедур [40% (27%; 55%) vs 3,7% (2%; 5%), $p=0,0001$], доли послеоперационных ран (79,4% vs 20,6 %). Согласно полученным данным в длительно существующих ранах есть признаки истощения пролиферативных процессов, определяемых по КР и экспрессии ядерного белка Ki67. Это приводит к дифференцировке фибробластов в фиброциты с последующим развитием фиброзной ткани. Послеоперационные раны относятся к острым и при своевременном обращении демонстрируют высокую пролиферативную активность.

Следует обратить особое внимание на такой параметр, как длительность существования раны до обращения за специализированной помощью. Как в международных, так и российских рекомендациях максимально быстрое обращение за специализированной медицинской помощью выделено в отдельный пункт, относящийся к профилактике ампутаций нижних конечностей. Следует отметить, что эта рекомендация основана в основном на мнении экспертов, чем на научно обоснованных доказательствах [195]. По нашим данным, длительность существования

язвенного дефекта имеет принципиальное значение и оказывает достоверно значимое влияние как на заживление, так и на его сроки.

В проведенном исследовании продемонстрирована зависимость принадлежности язвенного дефекта к тому или иному морфологическому фенотипу от длительности его существования. Кроме того, выявлено, что экспрессия различных факторов роста и рецепторов к ним достоверно выше в образцах язвенных дефектов длительностью менее 3-х месяцев. Это первая работа в мировой практике по оценке данного параметра в ранах различной длительности.

Для возможного объяснения полученных результатов следует обратиться к процессу заживления раневых дефектов. В своем развитии, независимо от этиологии, нарушение целостности кожных покровов проходит следующие стадии: воспаление, регенерация, эпителизация. При неосложненном течении длительность 1-ой фазы воспаления не превышает 3-5 суток, 2-ой - может достигать 30 дней, а эпителизация растягивается на многие месяцы. Для адекватного процесса заживления патофизиологические механизмы, заложенные в каждой фазе должны быть реализованы в полной мере. Так, для адекватного синтеза грануляционной ткани (2-ая фаза) в фазу воспаления рана должна быть полностью очищена от микробных агентов. В ней должны присутствовать в необходимом количестве факторы роста и рецепторы к ним. При этом, ведущая роль ФР в процессе заживления, особенно в фазе синтеза грануляционной ткани и эпителизации, не вызывает сомнения. Одними из источников большинства ФР являются активированные тромбоциты и клетки воспаления, в частности макрофаги, играющие ключевую роль как в первой фазе заживления, так и в инициации процессов синтеза грануляционной ткани в фазе пролиферации. Тромбоциты активируются и дегранулируются на ранних этапах процесса заживления в ответ на повреждение. Как указывалось выше, длительность фазы воспаления в норме не превышает 3-5 дней, но, при хронизации процесса

значительно удлиняется. С учетом полученных данных мы можем предположить, что тромбоциты, являясь одним из источников ФР, через длительный срок от момента возникновения раны уже не активны и не могут их синтезировать. Вторым важным продуцентом ФР являются макрофаги. При этом, ФР вырабатывают макрофаги с фенотипом M2 [200, 201]. Показано, что дисбаланс M1/M2 в сторону преобладания M1 приводит к хронизации процесса заживления и замедленной репарации [202, 203]. Учитывая, что в исследуемых группах отмечается значительное превышение сроков заживления по сравнению с показателями в норме, можно сделать вывод о наличии у макрофагов дисбаланса M1/M2 и, как следствие, сниженного количества ФР. Таким образом, в ранах, существующих более 3-х месяцев, уже нет эндогенных источников синтеза ФР. При этом, речь идет не только о макрофагах, но и о компонентах грануляционной ткани (капиллярная сеть и фибробласты), которые в длительно существующих ранах замещаются фиброзом. Таким образом, чем дольше существует рана, тем меньше в ней сохраняются клетки, ответственные за синтез ФР, что и продемонстрировано в данной работе.

Основываясь на концепции различий в патоморфологии и патофизиологии хронических ран при СДС, можно сделать вывод о различиях в подходах к лечению язвенных дефектов с разными морфологическими фенотипами. Оптимальным методом идентификации морфологического фенотипа является гистологическое исследование образца с вычислением коэффициента репарации и определением уровня экспрессии ядерного белка Ki67. К дополнительным маркерам можно отнести длительность существования раны до обращения за специализированной помощью, скорость сокращения площади раны после 4-х недель лечебных процедур, наличие раневого дефекта после хирургического вмешательства. Консервативные виды лечения ран при $Ki67 \leq 7\%$ продемонстрировали свою неэффективность, в связи с чем этих пациентов необходимо курировать

совместно с хирургами. Вероятность заживления таких язв составляет лишь 11%. В 88% случаев это раны, принадлежащие к МФ 2 вида с неполной репарацией и наличием фиброза. Средняя длительность существования раны до обращения за специализированной помощью в этой группе составляет 266 ± 440 дней. В подавляющем большинстве случаев (91%) такие язвенные дефекты сокращаются менее, чем на 10% от первоначального размера за 4 недели лечебных мероприятий. Ввиду того, что речь идет о пациентах с адекватным магистральным кровотоком, то объем и вид хирургического вмешательства должны определяться в рамках работы междисциплинарной команды, в состав которой входят ортопеды и пластические хирурги. Язвенные дефекты с уровнем экспрессии Ki67 > 7% можно продолжать лечить стандартными консервативными методами. Согласно наших данных, наличие в ране клеток, экспрессирующих один из маркеров стволовых клеток CD 34, влияет на скорость заживления хронических язвенных дефектов при СДС. CD 34 является маркером как предшественников, так и самих эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и влияет на ангиогенез. При наличии этих клеток в биоптате язвенные дефекты в 32% случаев заживали в течение 3-х месяцев, в 68% - в течение года. При их отсутствии не отмечено случаев заживления в течение 3-х месяцев, в 50% случаев раны заживали в течение года, в 50% - не заживали.

На основании полученных данных предложена модификация алгоритма ведения пациентов с язвенными дефектами при СДС (Рисунок 29). При обращении пациента с СДС назначается комплекс лечебно-диагностических мероприятий согласно стандартам оказания медицинской помощи. Через 4 недели оценивается скорость сокращения размеров раны. Сокращение размеров раны более, чем на 50% от первоначального размера можно расценить как прогностически положительный параметр эффективности проводимых лечебных мероприятий. Если рана сократилась менее чем на 50% от первоначального размера, то для определения

дальнейшей лечебной тактики пациентам с адекватным магистральным кровотоком и без признаков инфицирования необходимо определить вид морфологического фенотипа раны. Для этого выполняется морфометрия образца с определением КР, уровень экспрессии ядерного белка Ki67, оценивается длительность существования раны до обращения за специализированной помощью, скорость сокращения площади раны за 4 недели проведения лечебных мероприятий. Если по результатам дообследования выявляются раны с МФ 1 вида, то следует продолжать комплекс консервативных методов лечения. Если язвенный дефект принадлежит к МФ 2 вида, то дальнейшее лечение следует обсудить с ортопедами и/или пластическими хирургами в рамках междисциплинарного взаимодействия [Рисунки 30 (а,б), 31 (а,б)].

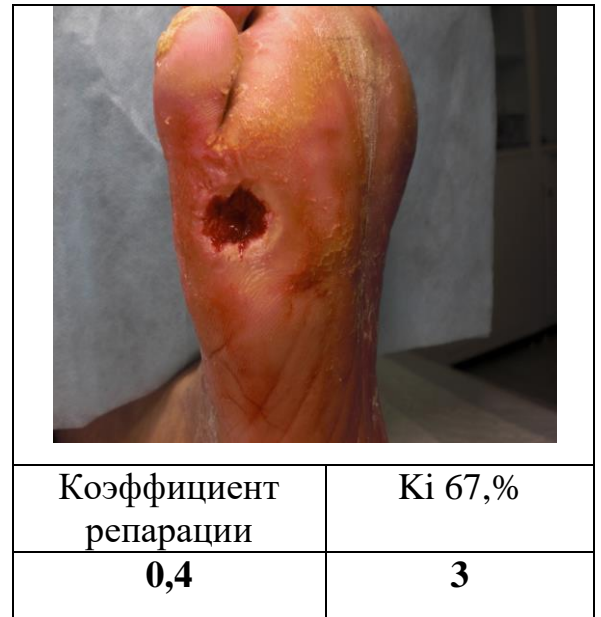
Согласно принятой практике, к лечению язвенных дефектов, площадь которых сокращается за 4 недели лечебных мероприятий менее, чем на 50%, рекомендуется рассмотреть вопрос о добавлении адьювантной терапии с целью ускорения процесса заживления. В нашей работе у этой категории больных в качестве адьювантной терапии в амбулаторных условиях использовались аппликации плазмы, обогащенной факторами роста, и внутрираневого инъекции эпидермального фактора роста. В обоих случаях ожидаемого эффекта от терапии (заживления или ускорения скорости сокращения площади раны) не получено. В этой связи, в настоящее время пациентам с длительно незаживающими язвенными дефектами в амбулаторных условиях назначение данного вида дополнительной терапии нами не рекомендуется.



Рисунок 29. Алгоритм персонализации лечебных мероприятий при хронических длительно незаживающих язвенных дефектах у больных с синдромом диабетической стопы.



а



б

Рисунок 30. Язвенные дефекты при нейропатической форме синдрома диабетической стопы: а- язвенный дефект, принадлежащий к морфологическому фенотипу 1; б - язвенный дефект, принадлежащий к морфологическому фенотипу 2



а



б

Рисунок 31. Исходы язвенных дефектов при нейропатической форме синдрома диабетической стопы: а- язвенный дефект, принадлежащий к морфологическому фенотипу 1; б - язвенный дефект, принадлежащий к морфологическому фенотипу 2

ВЫВОДЫ

1. У больных с хроническими ранами нижних конечностей при синдроме диабетической стопы, получающих специализированную помощь в амбулаторных условиях, нейропатическая форма синдрома диабетической стопы диагностирована в 67% случаев, нейро-ишемическая в 33%. Заживление язвенных дефектов происходило в 80,7 % случаев. Выполнение ампутаций потребовалось в 6,4% случаях, из которых 4,6% - в пределах стопы, 0,6% - на уровне голени, 1,2% - на уровне бедра.

2. У пациентов с признаками нарушения магистрального кровотока нижних конечностей риск выполнения высокой ампутации увеличивается в 1,7 раза при возрастании уровня HbA1c на 1%; в 3,2 раза - с увеличением возраста на каждые 10 лет; в 7,5 раз при увеличении глубины поражения мягких тканей на каждую степень по классификации Вагнера.

3. Идентифицировано два вида морфологических фенотипов тканей язвенных дефектов у пациентов с неинфицированной нейропатической формой синдрома диабетической стопы, различающихся по своему репарационному потенциалу. Морфологический фенотип 1 вида характеризуется преобладанием грануляционной ткани над фиброзом и некрозом. При морфологическом фенотипе 2 вида отмечается преобладание фиброза и некроза над грануляционной тканью. Средние значения коэффициента репарации при морфологическом фенотипе 1 вида в 2,4 раза выше, чем при морфологическом фенотипе 2 вида ($2,29 \pm 3,04$ vs $0,95 \pm 1,78$, $p=0.0001$). На фоне проводимого консервативного лечения язвенные дефекты, относящиеся к морфологическому фенотипу 1 вида, заживали в среднем в течение 133 дней (88; 218), а ко 2 виду - не заживали в течение года.

4. У больных с ранами морфологического фенотипа 1 вида длительность существования язвенных дефектов до обращения за специализированной помощью была в 3 раза меньше, чем у больных с

морфологическим фенотипом 2 вида [33 (10; 67) vs 98 (5; 378) дней, $p < 0,001$]. В этой подгруппе доля пациентов со скоростью сокращения площади раны $> 30\%$ за 4 недели лечения была в 16 раз больше (58% vs $3,7\%$, $p < 0,0001$); количество послеоперационных ран было выше в 4 раза ($79,4\%$ vs $20,6\%$, $p < 0,02$).

5. Молекулярные профили хронических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы, принадлежащих к разным морфологическим фенотипам значительно отличались по количеству клеток, экспрессирующих Ki67 [18 ± 6 (%) vs 4 ± 5 (%)], факторы роста (93% vs 7% , $p = 0,0001$) и рецепторы к ним (90% vs 10% , $p = 0,0001$), гладкомышечный актин (81% vs 19%), панцитокератин (85% vs 15%), маркеры стволовых клеток: CD 34 (75% vs 25%) и ALDH1 (81% vs 19%). Это указывает на различный репарационный потенциал язвенных дефектов, который определяет вероятность заживления и его сроки.

6. Наибольшую диагностическую ценность в оценке вероятности заживления язвенного дефекта на фоне консервативного лечения показал уровень экспрессии Ki 67 в биоптатах ран: при его величине $> 7\%$ вероятность заживления составила $94,5\%$, $\leq 7\%$ - $11,8\%$. Параметром, определяющим вероятность заживления раны за 3 месяца, является уровень экспрессии CD 34: при его отсутствии вероятность заживления раны за 3 месяца была равна 0, а при его наличии составила 32% .

7. Использование в амбулаторной практике эпидермального фактора роста (в виде внутрираневого инъецирования) и собственной плазмы, обогащенной факторами роста (в виде аппликаций) в местной терапии хронических язвенных дефектов у пациентов с длительно незаживающими язвенными дефектами не продемонстрировало клинических преимуществ по сравнению со стандартной терапией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для персонализации ведения пациентов с синдромом диабетической стопы целесообразно выполнять комплексную оценку клинικο-морфологических параметров язвенных дефектов, гистологические и иммуногистохимическое исследование биоптатов хронических язвенных дефектов с идентификацией морфологического фенотипа.

Клинико-морфологическую оценку состояния язвенного дефекта рекомендовано выполнять пациентам с адекватным магистральным кровотоком, без признаков инфекции, при обязательном соблюдении терапевтических стандартов лечения, включая режим разгрузки пораженной конечности.

3. Для идентификации вида морфологического фенотипа язвенного дефекта рекомендовано выполнять морфологический анализ образца с вычислением коэффициента репарации и определением уровня экспрессии ядерного белка Ki67. При значениях коэффициента репарации >1 и экспрессии Ki67 $> 7\%$ язвенный дефект относится к морфологическому фенотипу 1 вида; при значениях коэффициента репарации ≤ 1 и экспрессии Ki67 $\leq 7\%$ язвенный дефект относится к морфологическому фенотипу 2 вида.

К дополнительным клиническим параметрам идентификации морфологического фенотипа хронических ран при синдроме диабетической стопы относятся: длительность существования язвенного дефекта до обращения за специализированной помощью и скорость его сокращения за 4 недели лечения.

На основании выявленных морфологических фенотипов на догоспитальном этапе целесообразно использовать дополнительный алгоритм терапии больных с синдромом диабетической, позволяющий персонализировать лечебные мероприятия. В качестве основных маркеров

дифференцированного подхода рекомендуется использовать определение коэффициента репарации и экспрессии в биоптате язвенного дефекта ядерного белка Ki 67. В роли дополнительных маркеров могут применяться скорость сокращения площади раны за 4 недели лечебных мероприятий и длительность существования язвенного дефекта до обращения за специализированной медицинской помощью.

Пациентам с морфологическим фенотипом 1 вида показана консервативная стандартная терапия. Пациенты с морфологическим фенотипом 2 вида должны быть проконсультированы хирургом (ортопедом, пластическим) в максимально короткие сроки в рамках междисциплинарного взаимодействия с целью выработки наиболее эффективного подхода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЕ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АД- артериальное давление
- АН - автономная нейропатия
- ВАК - вакуум-ассоциированная терапия
- ВКМ - внеклеточный матрикс
- ГПК - гемопоэтическим/прогениторным клеткам
- ГКСФ - гранулоцит-колоний стимулирующий фактор
- ДИ - доверительный интервал
- ДР- диабетическая ретинопатия
- ДПН - диабетическая периферическая полнейропатия
- ДС- двойное слепоеклиническое исследование
- ИРП - индивидуальная разгружающая повязка
- ИФР- инсулиноподобный фактор роста
- ИФР_р - рецепторы к инсулиноподобному фактору роста
- К- контролируемое клиническое исследование
- КИ- критическая ишемия
- КР- коэффициент репарации
- ЛПИ - лодыжечно-плечевой индекс
- ММП - матриксные металлопротеиназы
- Мн - многоцентровое клиническое исследование
- МФ - морфологические фенотипы
- НД - нет данных
- НДС - нейропатический дисфункциональный счет
- НК - неконтролируемое клиническое исследование
- НР- нерандомизированное клиническое исследование
- П- проспективное клиническое исследование
- ОШ- отношение шансов
- ПЭК - предшественникам эндотелиальных клеток
- Р- рандомизированное клиническое исследование

СКФ - скорость клубочковой фильтрации
СЭФР- сосудисто-эндотелиальный фактор роста
СД- сахарный диабет
СДС- синдром диабетической стопы
СДСн- синдром диабетической стопы, нейропатическая форма
СДСни- синдром диабетической стопы, нейро-ишемическая форма
СЭФР-сосудистый эндотелиальный фактор роста
СЭФР_r- рецепторы к сосудистому эндотелиальному фактору роста
ТИМП - тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ
ТрФР - тромбоцитраный фактор роста
ТФР - тромбоцитарный фактор роста
ТФР- $\alpha\beta$ - трансформирующие факторы роста α и β
ФР- факторы роста
ФРК - фактор роста кератиноцитов;
ФРФ - фактор роста фибробластов
ХБП- хроническая болезнь почек
ЭК - эквиваленты кожи
ЭФР- эпидермальный фактор роста
ЭФР_r- рецепторы к эпидермальному фактору роста
ALDH1- альдегиддегидрогеназа 1 типа
СК- цитокератин
HbA_{1c}- гликированный гемоглобин
IL - интерлейкин
NT - нейротрофин
SMA- гладкомыечный актин
TcPO₂- транскутанная оксиметрия
TNF- α - фактор некроза опухоли- α

Список литературы

1. Профилактика и лечение заболеваний стопы при диабете // Руководство, документы и рекомендации. Полная русскоязычная версия. -М., 2016. - 168 с.
2. Jeffcoat W. Assessing the Outcome of the Management of Diabetic Foot Ulcers Using Ulcer-Related and Person-Related Measures / Chipchase S., Ince P., Game F.// Diabetes Care - 2006 - 29 (8)- P. 1784-1787.
3. Lev-Tov H. Cellular versus acellular matrix devices in treatment of diabetic foot ulcers: study protocol for a comparative efficacy randomized controlled trial/ Li C., Dahle S., Isseroff R// Trials -2013 (9);14:8; doi: 10.1186/1745-6215-14-8.
4. Удовиченко О.В. Эффективность амбулаторного лечения синдрома диабетической стопы в повседневной практике кабинета "Диабетической стопы": когортное исследование / Берсенева Е.А.// Сахарный диабет- 2014 (3)- С.107-112.
5. Armstrong D. Diabetic foot ulcers and their recurrence/ Boulton A., Bus S.// N Engl J Med- 2017; 376:2367-75; doi: 10.1056/NEJMra 1615439.
6. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 9-й выпуск (дополненный)/Под редакцией Дедова И.И., Шестаковой М.В., Майорова А.Ю. - М., 2019- С.117-126.
7. Huang S. Paracrine action of mesenchymal stromal cells delivered by microspheres contributes to cutaneous wound healing and prevents scar formation in mice /Yan Wu, Dongyun Gao, Xiaobing Fu//Cytotherapy - 2015;17(7):922-31. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.03.690. Epub 2015 May 1.
8. Millán-Rivero J. Silk fibroin scaffolds seeded with Wharton's jelly mesenchymal stem cells enhance re-epithelialization and reduce formation of scar tissue after cutaneous wound healing/ Martínez C., Romecín P., Aznar-Cervantes S., Carpes-Ruiz M // Stem Cell Res Ther - 2019;10(1):126. doi: 10.1186/s13287-019-1229-6

9. Schneider C. Lower Extremity Ulcers/ Stratman S., Kirsner R.S. // Med. Clin. N. Am. -2021;105:663–679. doi: 10.1016/j.mcna.2021.04.006.
10. Alam W. Clinical approach to chronic wound management in older adults/ Hasson J., Reed M. // J. Am. Geriatr. Soc.- 2021 doi: 10.1111/jgs.17177.
11. Токмакова А.Ю. Синдром диабетической стопы: клинические, морфологические, метаболические аспекты поражений мягких тканей и костных структур нижних конечностей у больных сахарным диабетом и терапевтические методы их коррекции: автореферат диссертации доктора медицинских наук:14.00.03/ Токмакова Алла Юрьевна- Москва, 2006- 50 с.
12. Зайцева Е.Л. Роль факторов роста и цитокинов в репаративных процессах в мягких тканях у больных сахарным диабетом/Токмакова А.Ю.// Сахарный диабет - 2014 (1)- С.57-62.
13. Токмакова А.Ю. Оценка состояния костной ткани у больных с синдромом диабетической стопы /Ульянова И.Н., Чернова Т.О., Анциферов М.Б.//Материалы IV Всероссийского конгресса эндокринологов "Актуальные проблемы современной эндокринологии".- Санкт-Петербург, 2001- С. 215.
14. International Diabetes Federation IDF Diabetes Atlas, 9th edn. International Diabetes Federation 2019 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF_Atlas_9th_Edition_2019.pdf
15. Дедов И.И. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование Nation)/ Шестакова М.В., Галстян Г.Р.//Сахарный диабет Сахарный диабет- 2016-19(2)-С.104-112. <https://doi.org/10.14341/DM2004116-17>.
16. Lazzarini P.A. Diabetes-related lower-extremity complications are a leading cause of the global burden of disability/Pacella R.E., Armstrong D.G., van Netten JJ// Diabet Med - 2018-doi: 10.1111/dme.13680.
17. Armstrong D.G. Five year mortality and direct costs of care for people with diabetic foot complications are comparable to cancer/ Swerdlow M.A.,

Armstrong A.A., Conte M.S., Paduls W.V., Bus S.A. // J.Foot Ankle Res.- 2020-13 - P. 1-4. doi: 10.1186/s13047-020-00383-2.

18. Beckert S. A New Wound-Based Severity Score for Diabetic Foot Ulcers/ Witte M., Wicke C. //Diabetes Care.-2006.- 29 (5) - P. 988-992.

19. Armstrong D.G. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence/ Boulton A.J., BusS.A.// N.Engl.J.Med. -2017-376- P. 2367–2375.
doi: 10.1056/NEJMra1615439.

20. Frykberg R.G. Diabetes foot disorders. A clinical practice guideline//J Foot and Ankle Surgery - 2006 - P. 62-66.

21. Zhang P. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta analysis/ Lu J., Jing Y., Tang S. // Ann Med - 2017 - 49 (2)- P. 106-116. doi: 10.1080/07853890.2016.123132

22. Ramsey S.D. Incidence, outcomes, and costs of foot ulcers in patients with diabetes/ Newton K. // Diabetes Care - 1999 (22)- P. 382-387.

23. Moss S.E. The prevalence and incidence of lower extremity amputation in a diabetic population/ Klein R. // Arch Intern Med - 1992 (152)- P. 610-616.

24. Wang A. Guidelines on multidisciplinary approaches for the prevention and management of diabetic foot disease (2020 edition)/ Lu G., Cheng X., Ma X // Burns Trauma - 2020; 8. doi: 10.1093/burnst/kaa017.

25. Галстян Г.Р. Эпидемиология синдрома диабетической стопы и ампутаций нижних конечностей в Российской Федерации по данным Федерального регистра больных сахарным диабетом(2013-2016 гг)/ Викулова О.К., Дедов И.И. // Сахарный диабет- 2018 -21(3)- С. 170-177.

26. Wrobel J.S. Geographic variation of lower-extremity major amputation in individuals with and without diabetes in the Medicare population/ Mayfield JA, Reiber GE.// Diabetes Care- 2001- 24(5)- P. 860–864.

27. Boulton A.J. The global burden of diabetic foot disease /Vileikyte L., Ragnarson-Tennvall G., Apelqvist J. // Lancet - 2005- 366(9498)-P. 1719– 1724.

28. Wierzba W. Geographic variability of major non-traumatic lower limb amputations in diabetic and non-diabetic patients in Poland / Krasnodębski P, Śliwczyński A, Karnafel W // *Ann Agric Environ Med.* - 2020 - 27(1)- P.76-79. doi: 10.26444/aaem/114725.
29. Международное соглашение по диабетической стопе- М.: Издательство "Берег", 2000- 96 с.
30. Kuzuya T. Prevalence of chronic complications in Japanese diabetic patients/ Kanuma Y.// *Diabetes Res.Clin.Pract.* -1994-24- P. 159-164.
31. Gujral J.S. Ethnic differences in the incidence of lower extremity amputation secondary to diabetes mellitus/ McNally P.G.// *Diabetic Medicine* - 1993- 10- P. 271-274.
32. Игнатъева В.И. Моделирование клинико-экономических аспектов оказания медицинской помощи больным с синдромом диабетической стопы в Российской Федерации/ Авксентьева М.В., Галстян Г.Р., Удовиченко О.В., Бреговский В.Б.// *Медицинские технологии. Оценка и выбор* - 2014-4- С.45-59.
33. Apelqvist J. Diabetic foot ulcers in a multidisciplinary setting - an economic analysis of primary healing and healing with amputation/ Ragnarsson-Tennval G., Persson U., Larsson J.//*J Int Med*- 1994- 235-P. 463-471.
34. American Diabetes Association Economic costs of diabetes in U.S. in 2002 *Diabetes Care*- 2003- 26- P. 917-932.
35. Ramsey S.D. Incidence, outcomes and cost of foot ulcers in patients with diabetes/ Newton K., Blough D., McCulloch D.K., Sandhu N., Reiber G.E. // *Diabetes Care* - 1999- 22- P. 382-387.
36. Holzer S.E. Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes/ Camerota A., Martens L., Cuerdon T., Crystal-Peters J., Zagari M. // *Clin Ther*- 1998- 20- P.169-181.

37. Amato D. The cost of illness in patients with diabetic foot ulcers/ Lantin M., Basso K., Martens L.//59th Annual Meeting of the American Diabetes Association, Abstract. San Diego, 1999.
38. Harrington C. A cost analysis of diabetic lower-extremity ulcers/ Zagari M.J., Corea J., Klitenic J.//Diabetes Care - 2000- 23-P. 1333-1338.
39. Reiber G.E. Lower extremity foot ulcers and amputations/Harris M.I., Cowie C., Stern M.P.// In Diabetes in America (2nd ed), NIH Publication No.95-1468; 1995, P.409-427.
40. Kerr M. The cost of diabetic foot ulcers and amputations to the National Health Service in England/Barron E., Chadwick P., Evans T., Kong W.M. et al. //Diabetes Medicine- 2019-36 (8)- P.995-1002, doi: 10.1111/dme.13973.
41. Crocker R.M. Patient perspectives on the physical, psycho-social, and financial impacts of diabetic foot ulceration and amputation/ / Palmer K.N., Marrero D.G., Tan T.W.//J Diabetes Complications- 2021-35(8):107960, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2021.107960. Epub 2021 May 23.
42. Selvarajah D. Diabetic peripheral neuropathy: advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention/ Kar D, Khunti K, Davies MJ, Scott AR, Walker J, Tesfaye S.//Lancet Diabetes Endocrinol.- 2019- 7(12)- P. 938-948. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30081-6. Epub 2019 Oct 14.
43. Frykberg R.G. A prospective, multicentre, open-label, single-arm clinical trial for treatment of chronic complex diabetic foot wounds with exposed tendon and/or bone: positive clinical outcomes of viable cryopreserved human placental membrane/ Gibbons G.W., Walters J.L., Wukich D.K., Milstein F.C.//Int Wound J.-2017-14 (3)-P.569-577.
44. Thorud J.C. Mortality after nontraumatic major amputation among patients with diabetes and peripheral vascular disease: a systematic review/ Plemmons B., Buckley J., Shibuya N.//The Journal of Foot and Ankle Surgery- 2016-55 (3)-P.591-599.

45. Liu R. Low extremity reamputation in people with diabetes: a systemic review and meta-analysis/Petersen B., Rothenberg G., Armstrong D. // BMJ Open Diabetes Res Care- 2021-9 (1)-e002325 - doi: 10.1136/bmjdr-2021-002325.
46. Pound N, Ulcer-free survival following management of foot ulcers in diabetes. / Chipchase S, Treece K, Game F, Jeffcoate W.// Diabet Med.- 2005-22(10)-P. 1306-1309; doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01640.x.PMID: 16176187.
47. Afram Akturk. Ulcer-free survival days and ulcer healing in patients with diabetic foot ulcers: a prospective cohort study//Jaap J. van Netten,Rene Scheer,Marloes Vermeer,Jeff G. van Baal//IWJ-2019-16 (5)- P.1365-1372.
48. Meijer JW. Quality of life in patients with diabetic foot ulcers/Trip J., Jaegers S.M., Links T.P., Smits A.J, J W Groothoff J.W., Eisma W.H.// Disabil Rehabil- 2001- 20;23(8)-P.336-404. doi: 10.1080/09638280010005585.
49. Valensi P. Quality of life and clinical correlates in patients with diabetic foot ulcers/Girod I., Baron F., Moreau-Defarges T., Guillon P//Diabetes Metab-2005-31-P:263-71.
50. Vileikyte L. Diabetic foot ulcers: a quality of life issue//Diabetes Metabolism Research and Reviews -2001-17 (4)- P: 246-249.
51. Комелягина Е.Ю. Русскоязычная версия опросника для оценки качества жизни больных с периферической полинейропатией: валидация и перспективы применения/Уварова О.М., Анциферов М.Б.//Сахарный диабет- 2014- 2- Стр.56-65.
52. Vileikyte L. Psychosocial research in the diabetic foot: are we making progress? /Pouwer F., Gonzalez J.// Diabetes Metabolism Research and Reviews - 2020-36 (Suppl. 1)-e 3257. doi: 10.1002/dmrr.3257.
53. McKeon K.C. The History of the Diabetic Foot//in: The Foot in Diabetes, 2nd Edition. Edited by Boulton A., Connor H., Cavanagh P.- 1994- P. 5-13.

54. LoGerfo F. Current concepts. Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes. Implications for foot care/Coffman D.//N Engl J Med -1984-20- 311 (25)- P.1615-9.
55. Edmonds M. Improved Survival of the Diabetic Foot: The Role of a Specialised Foot Clinic/ Blundell M., Morris M., Thomas E., Cotton L.,Watkins P.// QJM: An International Journal of Medicine - 1986- 60(232)- P.763-771.
56. Diabetes care and research in Europe: the Saint Vincent Declaration // Diabet Med- 1990 (7)- P. 360.
57. Forsythe R. Performance of prognostic markers in the prediction of wound healing or amputation among patients with foot ulcers in diabetes: A systematic review/ Apelqvist J., Boyko E., Fitridge R.// Diabetes Metab Res Rev. - 2020-36(S1):e3278.//doi.org/10.1002/dmrr.3278.
58. Harding JL. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence/ Pavkov M.E, Magliano D.J, Shaw J.E, Gregg E.W// Diabetologia- 2019-62(1)- P.3-16.
59. Carinci F. An in-depth assessment of diabetes-related lower extremity amputation rates 2000–2013 delivered by twenty-one countries for the data collection 2015 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)/ Uccioli L., Benedetti M., Sieds N.// Acta Diabetologica volume - 2020-57- P. 347–357.
60. Aydin K. Change in amputation predictors in diabetic foot disease: effect of multidisciplinary approach/ Islidak M., Karakaya J., Gurlek A.// Endocrine - 2010 - 38 (1)- P. 87-92.
61. Martinez-Gomez D. Reduction in diabetic amputations over 15 years in a defined Spain population. Benefits of a critical pathway approach and multidisciplinary team work/ Moreno-Carrillo M.A.//Rev Esp Quimioyer - 2014-27(3)- P. 170-179.

62. Rubio J. Reducing major lower extremity amputations after the introduction of a multidisciplinary team for the diabetic foot/ Aragon-Sanchez J., Jimenez S. // *Int J Low Extrem Wounds*- 2014- 13(1)- P.22-26.

63. Prompers L. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the different between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study/Schaper N., Apelqvist J., Edmonds M. // *Diabetologia*- 2008- (51)- P. 747-755.

64. Мамонтова Е.Ю. Прогностические факторы, влияющие на результат лечения язвенных поражений при синдроме диабетической стопы: автореферат диссертации кандидата медицинских наук:14.00.22; 14.00.03/ Мамонтова Елена Юрьевна- Москва, 2000- 29 с.

65. Vileikyte L. Psychological and Behavioural Issues in Diabetic Neuropathic Foot Ulceration // *In The Foot in Diabetes*, 2000 - P.121-131.

66. Weinger K. Psychosocial and Educational Implications of Diabetic Foot Complications/ Smaldone A. // *In The Diabetic Foot*. Second edition. Humana Press Inc- 2006 - P. 507-523.

67. Костюченко Б.М. Даценко Б.М. // *Раны и раневые инфекции*. М: Медицина, 1990 - С.186-297.

68. Mahdavian Delavary B. Macrophages in skin injure and repair/ Van der Veer WM, van Egmond M. // *Immunobiology*- 2011- 216 - P. 753-762.

69. Rodriguez-Prados JC. Substrate fate in activated macrophages : a comparison between innate, classic, and alterenative activation/ Traves P.G., Cuenca J. // *J Immunonol*. 2010- 185- P.605-614.

70. Mills CD. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease// *Crit Rev Immunol*. - 2012- 32- P. 463-488.

71. Wang N. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarisation balance/ Liang H., Zen K. // *Front Immunol*. - 2014- P. 605-614.

72. Chun Qing. The molecular biology in wound healing and non-healing wound // *Chinese Journal of Traumatology* - 2017- 20- P.189-193.

73. Mahdavian D.B. Macrophages in skin injure and repair/ Van der Veer W.M., Egmond M// Immunobiology- 2011- 216- P: 753-762
74. Rodriguez-Prados J.C. Substrate fate in activated macrophages : a comparison between innate, classic, and alterenative activation/ Traves PG, Cuenca J.//J Immunonol- 2010- 185- P. 605-614.
75. Hu M.S. SFRP2/DPP4 and FMO1/LSP1 Define Major Fibroblast Population in Human Skin/ Moore A.L., Longaker M.T. //Journal of Investigative Dermatology- 2018 -138 (4) -P.729-730.
76. Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis/ Murohara T., Sullivan A.// Science- 1997 - 275 - P. 964-967.
77. Fadini GP. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau/ Baesso I., Albiero M.// Atherosclerosis- 2008- 197- P. 496-503.
78. Santopaolo M. Bone marrow as a target and accomplice of vascular complications in diabetes/ Sambataro M., Spinetti G., Madeddu P. // Diabetes Metab Res Rev.- 2020- 36(S1)- P.1-6.
79. Morrison S.J. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells/ Scadden D.T.// Nature- 2014-505- P. 327-334.
80. Mendez-Ferrer S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations/ Lucas D., Battista M., Frenette P.// Nature- 2008- 452- P. :442-444.
81. Katayama Y. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow/ Battista M., Kao W.M.// Cell- 2006- 124 - P. 407-421.
82. Методическое руководство по лечению ран. – М.: ООО «Пауль Хартман», 2000 - С. 35-36.
83. Boulton A.J.M. The Pathway to Ulceration: Aetiopathogenesis// In: The Foot in Diabetes. 3rd edn., 2000 John Wiley & Sons, Ltd. 2000 - P. 19-31.

84. Scholzen T. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and skin immune systems /Armstrong CA, Bunnet NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. // *Exp Dermatol* - 1998 - 7- P. 81-96.
85. Ansel J.C. Skin-nervous system interactions/Kaynard A.H., Armstrong C.A., Olerud J., Bunnet N., Payan D.//*J Invest Dermatol* - 1996 - 106 - P. 198-204.
86. Kennedy W.R. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy/ Wendelschafer-Grabb G., Johnson T.// *Neurology* - 1996- 47 - P. 1042-1048.
87. Gibran N.S. Diminished neuropeptide levels contribute to impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus/ Jang Y.C., Isik F.F.// *J Surg Res* - 2002- 108- P.122-128.
88. Quattrini C. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy/Tavakoli M., Jziorska M., Panagiotis K., Malik R.//*Diabetes* - 2007 - 56 (8)- P.2148-2154.
89. Levy D.M. Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function/ Terenghi G., Gu X.H., Abraham R.R.// *Diabetologia* - 1992- 35- P. 889-897.
90. Levy D.M. Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study/ Karanth SS, Springal DR, Polak JM// *Diabetologia* - 1989- 32- P. 427-433.
91. Antezana M.A. Neural endopeptidase activity is increased in the skin of subjects with diabetic ulcers/Sullivan S.R., Usui M.L., Gibran N.S. // *J Invest Dermatol* 2002- 119- P.1400-1404.
92. Spenny M.L. Neural endopeptidase inhibition in diabetic wound repair/ Muangman P., Sullivan S.R., Bunnett N.W// *Wound Rep Regen* 2002- 10- P.295-301.
93. Delamaire M. Impaired leucocyte function in diabetic patients/ Maugendre D., Moreno M., Le Goff M.// *Diabetic Med* - 1997- 14- P. 29-34.

94. Wysocki J. The influence of thymus extracts on chemotaxis of polymorfonuclear neutrophils (PMN) from patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDD)/ Wierusz-Wysocka B., Wykretowicz A., Wysocki H.// *Thymus* -1992- 20- P. 63-67.

95. Ferraro F. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function/ Lymperi S., Mendez-Ferrer S.// *Sci Transl Med.* - 2011- P.3-10.

96. Clerici G. Saving the limb in diabetic patients with ischemic foot lesions complicated by acute infection/ Faglia E.// *IntJ Low Extrem Wounds*- 2014 -13 (4)- P. 273-93.

97. Rayfield E.J. Infection in diabetes: the case for glucose control/ Ault MJ, Keusch GT// *Am J Med* -1982- 72 - P. 439-450.

98. Pomposelli J.J. Early post-operative glucose control predicts nosocomial infection rate in diabetes patients/ Baxter J.K., Babineau T.J.// *J Parenter Enteral Nutr* - 1998- 22- P.77-81.

99. Charlesworth J.A. The compliment system in type 1 (insulin-dependent) diabetes/ Timmermans V, Golding J, Campbell LV// *Diabetologia* - 1987- 30- P.372-379.

100. Teixeira A.S. Glucose-induced inhibition of angiogenesis in the rat sponge granuloma is prevented by aminoguanidine/ Andrade S.P.//*Life Sci* - 1999- 64 - P. 655-662.

101. Cherry G. Wound healing/ Hughes M.A. // In *Oxford textbook of surgery*. Ed. By Peter J. Morris ad William C.Wood.- 2nd ed.. Oxford University Press. 2000. Vol.1. - P.130-159.

102. Glowacka E. The effect of LPS on neutrophilis from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis in vitro/ Banasik M., Lewkowicz P. // *Scand J Immunol.*- 2002 - 55- P. 210-217.

103. Wang M.J. The biological characteristics of dermal fibroblast of the diabetic rats with deep-partial thickness scald/ Qing C., Liao Z.J. // Zhonghua Shao Shang Za Zhi - 2006- 22- P. 42-45.

104. McCarty S.M. Proteases and delayed wound healing/ Percival S.L.//Adv Wound Care- 2013-2- P. 438–447.

105. Rafrihi H. Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing// Int. Wound -2011- 8 (1)-P.12-21.

106. Steed D. Role of Growth Factors in the Treatment of Diabetic Foot Ulceration// In: The Diabetic Foot, Second edition, Humana Press Inc. 2006 - P.447-459.

107. Мыскина Н.А. Клинико-лабораторные маркеры эффективности консервативной терапии трофических язв у больных сахарным диабетом. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.01.03/Мыскина Наталья Александровна- Москва, 2003 г.- 108 с.

108. Martins V.L. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair/ Caley M., O'Toole E.A. // Cell Tissue Res - 2013- 351- P.255-268.

109. Страхова Г.Ю. Особенности клиники, диагностики и консервативного лечения больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы и диабетической нефропатией. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.01.03/ Страхова Галина Юрьевна- Москва, 2008 г. - 132 с.

110. Зайцева Е.Л. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика интенсивности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы /Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.Я., Токмакова А.Ю.//Сахарный диабет- 2015-18 (4)- С. 66-71.

111. Neil J.A. Prevention of foot ulcers in patients with diabetes and end stage renal disease/ Knuckey C.J. Tanenberg R.J. // Nephrol. Nurs.J.- 2003-30 (1)- P.39-43.

112. Miao M.. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation/Niu Y., Xie T.// *Wound Repair Regeneration* - 2012-20- P.203–213.

113. Sindrilaru A. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice/ Peters T., Wieschalka S. // *J Clin Invest.*- 2011- 121- P.985–997.

114. Галстян К.О. Значение провоспалительных и метаболических факторов в развитии синдрома диабетической стопы. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.01.02/ Галстян Каринэ Оганесовна- Москва, 2020 г. - 114 с.

115. Wenk J. Selective pick-up of increased iron by deferoxamine-coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase 1 and lipid peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro: a new dressing concept/ Foitzik A., Achterberg V., Sabiwalsky A., Dissemond J., Meewes C., Reitz A., Brenneisen P., Wlaschek M., Meyer-Ingold W., Scharffetter-Kochanek K.// *J Invest Dermatol* - 2001-116-P.833

116. Maritim A.C. Diabetes oxidative stress, and antioxidants: a review/Sanders R.A., Watkins J.B.// *J Biochem Mol Toxicol*-2003-17-P.24-38.

117. Monboisse J.C.Oxidative damage to collagen/Borel J.P.// *EXS*-1992-62-P:323-327.

118. Kennett E.C./Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism/ Davies M.J.// *Free Radic Biol Med*-2007-42-P:1278-1289.

119. Diegelmann R., Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing/ Evans M.// *Frontiers in Bioscience* - 2004- 9- P:283-289.

120. Федоров Д.Н. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия при репарации длительно незаживающих ран. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.00.15/ Федоров Дмитрий Николаевич- Москва, 2002 г. - 107 с.

121. Nwomeh, B. C Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds/ Liang, H. X., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., and Yager, D. R// Wound Repair Regen - 1998- 6- P. 127.

122. Nwomeh, B. C. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers/ Liang, H. X., Cohen, I. K., and Yager, D. R.// J Surg Res-1999-81-P: 189.

123. Yager, D. R Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids/ Zhang, L. Y., Liang, H. X., Diegelmann, R. F., and Cohen, I. K// J Invest Dermatol, -1996-107-P. 743.

124. Blakytyn R. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers/ Jude E //The International Journal of Lower Extremity Wounds - 2009- 8- P. 95-104

125. Bandyopadhyay B. A “traffic control” role for TGFbeta3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healin/ Fan J., Guan S. // J Cell Biol.- 2006- 172- P.1093-1105.

126. Vas P. Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic foot ulcers in diabetes: a systematic review/ Rayman G., Dhatariya K, , Driver V.//Diabetes Metab Res Rev. - 2020-36(S1):e3284. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3284>.

127. Pourmoussa A. An update and review of cell-based wound dressing and their integration into clinical practice/Gardner D., Johnson M., Wong A.//Ann Transl Med -2016- 4(23)- P.457.

128. Мелешина А.В. Тканеинженерные конструкторы кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (обзор) /Быстрова А.С., Рогова О.С., Воротеяк Е.А., Васильев А.В., Зайганова Е.В.//Современные технологии в медицине - 2017- 9(1)- С.198-218.

129. Fetterolf D. Dehydrated human amniotic tissue improves healing time, cost of care/Savage R.//Today's Wound Clinic-2013- 7(1)- P.19-20.

130. Fetterolf D. Scientific and clinical support for the use of dehydrated amniotic membrane in wound management/ Snyder R.J.//Wounds- 2012- 24 (10)-P.299-307.
131. Maan Z.N. Cell recruitment by amnion chorion grafts promotes neovascularisation/ Rennert R.C., Koob T.J.// J Surg Res-1015- 193(2)-P.953-62.
132. Shah A.P. Using amniotic membrane allografts in the treatment of neuropathic foot ulcers//J Am Podiatr Med Assoc - 2014- 104(2)-P.198-202.
133. Frykberg R.G A prospective, multicentre, open-label, single-arm clinical trial for treatment of chronic complex diabetic foot wounds with exposed tendon and/or bone: positive clinical outcomes of viable cryopreserved human placental membrane/ Gibbons G.W., Walters J.L., Wukich D.K., Milstein F.C.// Int Wound J - 2017- 14- P.569-77.
134. Raspovich K.M Effectiveness of viable cryopreserved placental membranes for management of diabetic foot ulcers in real world setting/ Wukich D.K., Naiman D.Q.// Wound Rep Reg -2018 -P. 1-8.
135. Gibbons G. Grafix[®] a Cryopreserved Placental Membrane, for the Treatment of Chronic//Adv Wound Care (New Rochelle)- 2015 - 4 (9)- P. 534-544. doi: 10.1089/wound.2015.0647.
136. Qi M. Growth factors in the pathogenesis of diabetic foot ulcers/Zhou Q., Zeng W.// Front Biosci (Landmark Ed)- 2018-Jan 1-23-P.310-317.
137. Park J.W. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration/Hwang S.R, Yoon IS// Molecules- 2017-Jul27-22(8). E1259. doi: 10.3390/molecules 22081259.
138. Patel S. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing/ Srivastava A, Singh M// Biomedicine & Pharmacotherapy- 2019-112:108615.
139. Bruhn-Olszewska B. Molecular factors involved in the development of diabetic foot syndrome/Korzon-Burakowska A., Gabig-Cimińska M., Olszewski P. // Acta Biochim Pol.- 2012-59(4)-P.507-513.

140. Moustakas A. TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition/ Heldin P. //Biochim Biophys Acta- 2014 - (1840)- P. 2621-2634.
141. Yan C. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2/ Grimm W.A., Garner W.L.//Am J Pathol. 2010;176:2247-2258).
142. Yoshida M. TGF- β - operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells through Smad - and p38 MAKP-dependent signals/ Okubo N., Chosa N.//Int J Biol Sci.- 2012- 8-P.1062-1074.
143. Cohen S. Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal //J Biol Chem.- 1962- 237- P.1555-1562.
144. Nanney L. Epidermal and dermal effect of epidermal growth factor during wound repair//J Invest Dermatol. - 1990-94- P. 624-629.
145. Tiaka E.K. Epidermal Growth Factor in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: An Update/ Papanas N., Manolakis A.C, Georgiadis G.S.//Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.- 2012- 24(1)- P. 37-44.
146. Barrientos S. Growth factors and cytokines in wound healing/ Stojadionovic O, Golinko M. //Wound Repair Regen.- 2008-16- P. 585-601.
147. Acosta J.B. Epidermal growth factor intralesional infiltration can prevent amputation in patient with advanced diabetic foot wounds/ Savigne W., Valdez C. //Int Wound J.- 2006-3- P.232-239.
148. Brown G.L. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor/ Curtsinger L., Nanney L.//N Engl J Med.- 1989-321- P:76-80.
149. Tsang M.W. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers/ Wong W.K., Hung C.S//Diabetes Care- 2003-26- P.1856-1861.

150. Hong J.P. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers/ Jung H.D., Kim Y.W.//Ann Plast Surg.-2006-56- P. 394-398.

151. Viswanathan V. A phase III study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human epidermal growth factor (REGEN-DTM 150) in healing diabetic foot ulcers/ Pendsey S.//Wounds - 2006 - 18 - P.186-196.

152. Fernandez-Montequin J.L. Intralesional injections of Citoprot-P (recombinant human epidermal growth factor) in advanced diabetic foot ulcers with risk of amputation/ Infante-Cristia E., Valenzuela-Silva C.//Int.Wound J. - 2007-4- P. 333-343.

153. Tuett H.L. The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results/ Nguen Quynh T.T, Vo Hoang Minh H.//Int Wound J. 2009-6- P. 159-166.

154. Fernandez-Montequin J.L. Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study/ Valenzuela-Silva C.M., Diaz O.G.// Int Wound J. - 2009- 6 - P. 432-443.

155. Fernandez-Montequin J.L. Intralesional administration of epidermal growth factor-based formulation (Heberprot – P) in chronic diabetic foot ulcer: treatment up to complete wound closure / Betancourt B., Leyva-Gonzalez G., Mola E., Galan-Naranjo K., Ramirez-Navas M.// Int Wound J.- 2009- 6 - P. 67-72.

156. Gomez-Villa R. Efficacy of intralesional recombinant human epidermal growth factor in diabetic foot ulcers in Mexican patients: A randomized double-blinded controlled trial/ Aguilar-Rebolledo F., Lozano-Platonoff A., Teran-Soto J., Fabian-Victoriano M.// Wound Rep Reg -2014- 22 - P. 497-503.

157. Henning P.R. Platelet-rich plasma in the foot and ankle/ Grear B.C.// Current Reviews in Musculoskeletal Medicine- 2018-11- P. 616–623

158. McCarrel T.M. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy/ Minas T., Fortier L.A.// J Bone Joint Surg American volume- 2012-94 (19): e143(1–8).

159. Knighton D.R. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula/ Ciresi KF.//Surg Gynecol Obstet.-1990- 170 - P. 56-60.

160. Steed D.L. Clinical trials with purified platelet realisate/ Golsten B., Hambley R. //In: Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds. Edited by Barbul A., Liss A. New York. 1990:103-113.

161. Knighton D.R. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds/ Ciresi KF. //Ann Surg. - 1986-104- P. 322-330.

162. Atri S.C. Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers/Misra J. // Surgery- 1990 - (108)- P.508-512.

163. Takashi H. Topical application of platelet-rich plasma for diabetic foot ulcers: a systematic review/ Ruff E., Surani S., Ratnani J.//World J Diabetes- 2018 - October 15- 9(10)- P.172-179.

164. Просянникова Н.В. Аутологичная, богатая тромбоцитами плазма, в лечении язвенных поражений кожи нижних конечностей: Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.- Москва. - 2014. Доступно по: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01005550117>.

165. Халимов Э. В. Тромбоцитарный концентрат в комплексном лечении язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы/ Михайлов А.Ю., Иванова Л.М. // Труды Ижевской государственной медицинской академии. - 2018.- Т. 56. -С. 57-58.

166. Obolenskiy V.N. Clinical and economic effectiveness of the use of platelet-rich plasma in the treatment of chronic wounds/ Ermolova D.A., Laberko L.A. //Wound Medicine- 2017-19- P.27–32.

167. Serra R. Application of platelet rich gel to enhance healing of transmetatarsal amputations in diabetic dysvascular patients/ Buffone G, Dominijanni A.// *Int Wound J.* - 2013-10- P.612–615.

168. Kontopodis N. Effectiveness of platelet- rich plasma to enhance healing of diabetic foot ulcers in patient with concomitant peripheral disease/Tavlas E., Papandopoulos G.//*Int J Low Extrem Wounds*- 2015- March20- pii:1534734615575829.

169. Jeong S.H. Treatment of diabetic foot ulcers a blood bank concentrate/ Han S.K., Kim W.K. // *Plast Reconstr Surg.*- 2010-125- P.944-52.

170. Game F. LecoPatch system for management of hard- to-heal diabetic foot ulcers in the UK, Denmark, and Sweedan: an observer-masked, randomised controlled trial/ Jeffcoat W., Tarnow L.//*Lancet Diabetes Endocrinol* - 2018- Nov - 6(11)-P:870-878.

171. Alvaro-Alfonso F.J. Management of hard-to heal diabetic foot ulcers: use of autologous leucocytes, platelets and fibrin multi-layered patches (LeucoPatch)/Lazaro-Martinez JL, Garcia-Alvarez Y, Papanas N.// *Ann Trans Med* -2018- 6 (Suppl 2)- P.126.

172. Eldor R. New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies/Raz I., Ben Yehuda A., Boulton A.J.// *Diabet Med* - 2004- 21(11)- P.1161-1173.

173. Falanga V. New treatment for diabetic foot ulcers (a) growth factors. In: *The Foot in Diabetes*, edited by Boulton A.J., Connor H., Cavanagh P- 3rd ed.- Chichester, UK: Wiley & Sons - 2000-P.169-178.

174. Papanas N. Benefit-risk assessment of becaplermin in the treatment of diabetic foot ulcers/ Maltezos E.// *Drug Saf*- 2010- Jun 1- 33 (6)- P.455-461.

175. Профилактика и лечение заболеваний стопы при диабете // Руководство, документы и рекомендации. Полная русскоязычная версия. 2016:C.163. [International Consensus on the Diabetic Foot. Russian version. 2016:148-162].

176. Martí-Carvajal A. Growth factors for treating diabetic foot ulcers/ Glud C., Nicola S.//Cochrane Systematic Review - Intervention Version published: 28 October 2015.

177. Boulton A.J. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy/Jervell J.A.//Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy// Diabetic Medicine- 1998-15- P.508-514.

178. Wagner F. Algorithms of foot care/Levin M., O'Neal L. //In: The Diabetic Foot- 3rd ed.-St.Louis, MO: CV. Mosby- 1983- P.291-302.

179. Lipsky B. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections/ Berendt A., Cornia P., James C., Peters E., Armstrong D. // Clinical Infectious Diseases - 2012- 54(12)- P.132–173.

180. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы //Раны и раневые инфекции -2015-2 (3)- С.63-83.

181. Нефедова Н.А. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте/ Харлова О.А., Данилова Н.В., Мальков П.Г.// Архив Патологии - 2016-2- С. 54-62. doi: 10.17116/patol201678255-62.

182. Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis/ Murohara T, Sullivan A.// Science - 1997- 275- P.964-967.

183. Пучинская М.В. Маркеры опухолевых стволовых клеток и их прогностическое значение// Архив Патологии 2016- 2- С.47-54. doi: 10.17116/patol201678247-54).

184. Schaper N. Practical Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease (IWGDF 2019 update)/ Netten J., Apelqvist J., Bus S.//Diabetes Metab Res Rev.- 2020 - 36 (S1): e3266. doi.org/10.1002/dmrr.3266.

185. Spraul C.W. Effect of growth factors on bovine retinal pigment epithelial cell migration and proliferation/ Kaven C., Lang G.K., Lang G.E.// Ophthalmic Res -2004- 36 (3)- P.166-171.

186. Khan Z.A. Growth factors in proliferative diabetic retinopathy / Chakrabarti S.// *Experimental Diabetes Research* - 2003- 4 (4)- P.287-301.
187. Loot M.A. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-1, bFGF and PDGF-AB compared to controls/ Kenter S.B., Au F.L.// *Eur J Cell Biol*-2002-81-P.153-160.
188. Hehenberger K. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C- inhibitors/ Hansson A.// *Cell Biochem Funct*- 1997- 15-P. 197-201.
189. Galakowska H. Chemokines, Cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cell in the margin of chronic diabetic foot ulcers/ Wojewodska U., Olszewski W.L.// *Wound Repair Regen.* - 2006-14-P.558-565.
190. Vamos E.P. Changes in the incidence of lower extremity of low extremity amputations in individuals with and without diabetes in England between 2004 and 2008. / Bottle A., Edmonds M.E., Valabhji J., Majeed A., Millet C. // *Diabetes Care*- 2010- 33- P. 2592-2597.
191. Holman N. Variation in the incidence of amputation of the lower limb in England/ Young R.J., Jeffcoate W.J.// *Diabetologia* - 2012- 55 - P. 1919-1925.
192. Ragnarson-Tennvall G. Health-economic consequences of diabetic foot lesions/ Apelqvist J. // *Clin Infect Dis* - 2004 -39 (2) P. S132-S139.
193. World Health Organisation WHO. World Diabetes Day: too many people are losing lower limbs unnecessarily to diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr61/en/index.html>.
194. Diabetes Care and research in Europe: The Saint Vincent Declaration. *Diabet Med* ,1990 -P. 7-360.
195. Prompers L. High prevalence of ischemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from Eurodiale study / Huijberts M., Apelqvist J., Jude E., Piaggese A., Bakker K.// *Diabetologia* - 2007- 50- P.18-25.

196. Ólafsdóttir A. Excess risk of lower extremity amputations in people with type 1 diabetes compared with the general population: amputations and type 1 diabetes/ Svensson A-M., Pivodic A. et al.// *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2019; 7(1): e000602.doi: 10.1136/bmjdr-2018-000602.
197. Arya S. High Hemoglobin A1c Associated With Increased Adverse Limb Events In Peripheral Arterial Disease Patients Undergoing Revascularization/ Binney Z., Khakharia A., Long C. et al.// *J Vasc Surg*.- 2018 - 67(1)- P. 217–228.e1.
198. Gardner S. A. A prospective study of the PUSH tool in diabetic foot ulcers/Hillis S., Frantz R.//*J Wound Ostomy Continence Nurse*- 2011- 38 (4)- P.385-393. doi:10.1097/WON.0b013e31821e4dbd.
199. Sheehan P. Early change in wound area as a predictor of healing in diabetic foot ulcers: Knowing "when to say when"//*Plast Reconstr Surg*- 2006-117- P.245-247.
200. Sheehan P. Percent Change in Wound Area of Diabetic Foot Ulcers Over a 4-Week Period Is a Robast Predictor of Complete Healing in a 12-Week Prospective Trial// Jones P., Caselli A., Giurini J., Veves A.// *Diabetes Care* - 2003- .26 (6)- P. 1879-1882.
201. Song E. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts// *Cell Immunol*- 2000 - 204 (1)- P.19-28.
202. Sunderkotter C. Macrophage-derived angiogenesis factors/ Goebler M., Schulze- Osthoff K. et.al// *Pharmacol Ther*- 1991- 51(2)-P.195-216.
203. Koh T. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage/ DiPietro L.A.//*Expert Rev Mol Med*- 2011-13- P.e23.

