

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика  
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

БИНИЕНКО МИХАИЛ АНАТОЛЬЕВИЧ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ  
БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

14.01.17 – хирургия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук  
Давыденко Владимир Валентинович

Санкт-Петербург

2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЭКВИВАЛЕНТОВ КОМПОНЕНТОВ КОЖИ В ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ (ОБЗОР ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ).....	9
1.1. Современные представления о патофизиологии раневого процесса.....	9
1.2. Факторы, нарушающие процесс заживления ран у больных сахарным диабетом.....	12
1.3. Общая характеристика современных методов лечения трофических язв при синдроме диабетической стопы .....	15
1.3.1. Снижение внешнего давления и защита трофических язв от повреждения .....	16
1.3.2. Восстановление кожного перфузионного давления .....	17
1.3.3. Устранение инфекции.....	18
1.3.4. Метаболический контроль и лечение сопутствующих заболеваний .....	21
1.3.5. Современные принципы местного лечение трофических язв при синдроме диабетической стопы.....	21
1.4. Биотехнологические эквиваленты компонентов кожи.....	24
1.4.1. История местного применения клеточных культур для заживления ран.....	25
1.4.2. Бесклеточные биотехнологические раневые покрытия .....	27
1.4.3. Виды кожных эквивалентов .....	27
1.4.4. Применение кожных эквивалентов при синдроме диабетической стопы.....	32
1.4.5. Клиническое применение дермального эквивалента российского производства .....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	35
2.1. Общая характеристика обследованных лиц .....	35
2.2. Методика приготовления дермального эквивалента .....	41
2.3. Методика применения дермального эквивалента у больных с синдромом диабетической стопы.....	44
2.4. Методы обследования.....	46
2.5. Оценка состояния кровоснабжения нижних конечностей .....	47
2.5.1. Оценка магистрального кровотока в нижних конечностях .....	47
2.5.2. Оценка периферического кровоснабжения .....	50
2.6. Исследование и оценка трофической язвы.....	51
2.7. Статистическая обработка полученных результатов .....	55
2.8. Оценка безопасности и побочных отрицательных явлений при применении дермального эквивалента .....	56

2.9. Этические аспекты данного клинического исследования.....	56
2.10. Дизайн исследования .....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....	59
3.1. Исходные (перед началом исследования) показатели лабораторного и инструментального исследования у обследованных пациентов.....	59
3.1.1. Исходные показатели гликемии .....	59
3.1.2. Исходные показатели состояния магистрального кровообращения по данным ультразвукового ангиосканирования и ангиографии .....	59
3.1.3. Исходные показатели перкутанного напряжения кислорода .....	60
3.1.4. Исходная микробная обсемененность трофической язвы .....	61
3.1.5. Исходные показатели скорости заживления трофических язв.....	61
3.2. Оценка скорости заживления трофических язв у обследованных пациентов после начала дифференцированного местного лечения.....	62
3.3. Безопасность и побочные отрицательные явления при применении дермального эквивалента .....	64
3.4. Факторы, ограничивающие эффективное применение дермального эквивалента.....	69
3.5. Отдаленные результаты (12 месяцев наблюдения).....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	80
ВЫВОДЫ .....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, которое постепенно приобретает черты неинфекционной эпидемии: исходя из современных оценок к 2035 году распространенность СД в мире возрастет почти до 600 миллионов человек, причем около 80% этих больных будут проживать в развивающихся странах (Белозерцева Ю.П. и др., 2016; Гурьева И.В., 2016; Picard F. et al., 2017). В связи с ранней инвалидизацией и высокой смертностью от поздних осложнений СД во всем мире относится к числу серьезных медико-социальных и экономических проблем (Анциферов М.Б., Комелягина Е.Ю., 2013; Игнатович И.Н., Кондратенко Г.Г., 2013; Дедов И.И. и др., 2017). Среди наиболее частых и грозных осложнений СД – развитие у пациентов синдрома диабетической стопы (СДС) (Сонис А.Г. и др., 2017; Schaperг N.C. at al., 2017). СДС характеризуется возникновением хронических гнойно-некротических процессов (трофических язв) на стопе с поражением кожи, мягких тканей и костно-суставного аппарата (Белозерцева Ю.П. и др., 2016; Мадянов И.В., 2016). У больных с СДС язвенные дефекты имеют характер хронических ран, отличаются большой длительностью существования, часто неблагоприятным прогнозом для заживления (Корейба К.А., 2016). Спонтанная эффективная репарация язв при СДС, как правило, невозможна (Vella L., Formosa C., 2017). Диабетические язвы стопы заживают лишь в 2/3 всех случаев, а рецидив достигает 60–70 % (Спичкина О.Г. и др., 2012). У 28 % пациентов язвенное поражение может привести к ампутации нижней конечности того или иного уровня (Гурьева И.В., 2016; Чаканов Т.И., Култаев У.Т., 2016). Ежегодно более 1 миллиона больных СД теряют по крайней мере часть ноги в результате осложнения основного заболевания. Каждые 20 секунд где-то в мире производится ампутация нижней конечности из-за диабета (Гурьева И.В., 2016). Смертность после ампутации в раннем послеоперационном периоде может достигать 23 %. Кроме того, в последующие 5 лет в 8–22 % случаев возможно проведение реампутации на той же конечности или ампутации контрлатеральной конечности в 26–50 % случаев (Анциферов М.Б., Комелягина Е.Ю., 2013). Через 3 года выживаемость в этой группе в среднем составляет 50 %, через 5 лет – 40 % (Анциферов М.Б., Комелягина Е.Ю., 2013).

У больных с СДС язвенные дефекты имеют характер хронических ран, отличаются большой длительностью существования, часто неблагоприятным прогнозом для заживления. Это обусловлено следующими обстоятельствами: нарушением синтеза факторов роста, изменением процессов аккумуляции коллагена, из-за дезорганизации, миграции и пролиферации фибробластов, перестройки экстрацеллюлярного матрикса и ремоделирование тканей, повышения уровня матриксных металлопротеиназ, что замедляет формирование

коллагена (Корейба К.А., 2016). Это происходит на фоне снижения количества нервных волокон, изменения локальной гемодинамики. Если продукция межклеточного вещества интенсивна, а ферментов, разрушающих его избыток недостаточна, развивается грубый гипертрофический рубец. Если созревание межклеточного вещества неполное, то это проявляется келоидным рубцом (Шаповалова Е.Ю. и др., 2017). Патологические рубцы приводят к рецидиву язв. Таким образом, спонтанная эффективная репарация язв при СДС, как правило, невозможна.

Лечение трофических диабетических язв, несмотря на достижения медицины, остается сложной, не решенной полностью проблемой: как правило, сроки заживления очень длительные: даже с лучшим доступным стандартом терапии в течение 12–20 недель, могут зажить соответственно только 24 % – 30 % язв (Lev-Tov H. et al., 2013). Часто стандартные методы лечения не приносят эффекта (Спичкина О.Г. и др., 2012; Kraus I. et al., 2017).

Аутодермопластика свободным расщепленным лоскутом является одним из методов закрытия язвенных дефектов. Однако, по данным литературы, аутодермопластика для закрытия язвенных дефектов при СДС является недостаточным эффективным методом лечения (Гостищев В.К. и др., 2009; Ярец Ю.И. и др., 2010; Винник Ю.С. и др., 2011; Павлышин А.В. и др., 2013). Результат закрытия язвенного дефекта не всегда успешен и технически труден на определенных отделах стопы. По данным различных авторов, риск отторжения трансплантата при этом составляет 10–30 %. Кроме того, высок риск образования дополнительного хронического раневого дефекта в области взятия кожного лоскута на фоне диабетической полинейропатии, микро- и макроангиопатии (Спичкина О.Г. и др., 2012). Эпителизация донорских участков, по данным различных авторов, осложняется нагноением и длительным заживлением в 5–70 % случаев (Зорин В.Л. и др., 2009, Ярец Ю.И. и др., 2010). При этом длительное заживление донорских ран ведёт к образованию гипертрофических и келоидных рубцов (Зорин В.Л. и др., 2009).

В связи с перечисленными выше обстоятельствами, необходим поиск новых методов лечения, направленных на ускорение заживления раневого дефекта при СДС.

### **Степень разработанности темы исследования**

С этой целью перспективным может быть применение продуктов клеточных технологий. Так, в зарубежных исследованиях показана высокая клиническая эффективность применения биоинженерных заменителей кожи, содержащих дермальные фибробласты, таких как «Dermagraft», «AlloDerm», «Apligraf» (Lev-Tov H. et al., 2013; Krishna S. Vyas and Henry C. Vasconez, 2014; Frykberg RG et al., 2015; Rice J.B. et al., 2015). Применение эквивалентов кожи уменьшает болевой синдром, воспаление, ускоряет заживление ран, а также предотвращает образование рубцов, контрактуры и пигментных дефектов (Мелешина А.В. и др., 2017;

Шаповалова Е.Ю. и др., 2017; Zhong S.P., Zhang Y.Z. et al. 2010). В России, среди эквивалентов кожи, наибольший клинический опыт имеется при применении отечественного биотехнологического клеточного продукта «Дермальный Эквивалент» (ДЭ) (производства НИИ цитологии РАН) – аналога дермального слоя кожи, сформированного из культивированных фибробластов человека, заключенных в коллагеновый гель. Показана эффективность ДЭ при лечении обширных ожогов и трофических язв венозной этиологии (Андреев Д.Ю. и др, 2013; Королева Т.А., 2014; Лапин А.Ю. и др., 2014; Алейник Д.Я. и др., 2015; Блинова М.И. и др., 2015; Маркова А.Н. и др., 2016). Однако, данные по применению ДЭ в лечении трофических язв при СДС единичны, поэтому в научной литературе отсутствуют аргументированные свидетельства в пользу применения этой технологии по сравнению со стандартным лечением, что и обусловило необходимость данного исследования.

### **Цель исследования**

Оценить возможность улучшения результатов лечения трофических язв при СДС путем использования ДЭ.

### **Задачи исследования**

1. Изучить у больных с нейропатической и нейроишемической формой СДС скорость заживления язвенного дефекта при однократном использовании ДЭ в сравнении со стандартными методами лечения.
2. Изучить безопасность использования ДЭ при лечении трофических язв при СДС.
3. Определить длительность терапевтического эффекта однократного использования ДЭ у больных с нейропатической и нейро-ишемической формами СДС.
4. Определить у больных с СДС исходные факторы, ограничивающие эффективность применения ДЭ.
5. Изучить отдаленные результаты при использовании ДЭ у больных с СДС в сравнении со стандартным лечением.
6. Изучить эффективность повторного применения ДЭ при СДС.

### **Научная новизна**

Впервые проведено комплексное сравнительное исследование влияния ДЭ (аллогенных фибробластов, заключенных в коллагеновый гель) на заживление язвенного дефекта в стадии грануляции у больных как с нейроишемической, так и нейропатической формами СДС по отношению к стандартным методам лечения и доказано его существенное преимущество и безопасность. Разработана методика применения ДЭ трофических язв при СДС. Определены длительность терапевтического эффекта однократного применения ДЭ при СДС и исходные

факторы, ограничивающие его применение. Изучены отдаленные результаты применения ДЭ при СДС, показана эффективность повторного применения ДЭ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Основные положения и выводы диссертационного исследования позволяют обосновывать целесообразность применения ДЭ при лечении СДС, что дает возможность ускорить процесс заживления трофических язв, сократить сроки пребывания пациентов в стационаре и период амбулаторного лечения, уменьшить процент ампутаций нижних конечностей, увеличить сроки безрецидивного периода по сравнению с традиционным лечением.

Способ лечения трофических язв при СДС с применением дермального эквивалента внедрен в работу клиники госпитальной хирургии № 2 ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, отделения гнойной хирургии СПбГБУЗ «Госпиталя для ветеранов войн», отделения лечения хирургических осложнений сахарного диабета СПб ГБУЗ «Городская больница №14».

Результаты научных исследований используются в лекционном курсе и практических занятиях на кафедре госпитальной хирургии № 2 ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Применение ДЭ у больных как с нейропатической, так и с нейроишемической формами СДС в стадию грануляции язвенного дефекта достоверно ускоряет процесс заживления по сравнению со стандартным лечением, в большей степени при нейропатической форме.

2. Применение ДЭ у больных с СДС безопасно.

3. Увеличение скорости заживления язв после однократного применения ДЭ у больных с СДС, по сравнению со стандартным лечением, сохраняется в течение 1 месяца.

4. Исходные факторы, ограничивающие эффективное применение ДЭ у больных с СДС: низкие показатели перкутанного напряжения кислорода ( $TcPO_2$ ), лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ); высокая степень бактериальной обсемененности язвы, наличие сопутствующей патологии: хронический отек нижних конечностей, железодефицитная анемия, ожирение.

5. Применение ДЭ у больных с СДС в сроки наблюдения до 12 месяцев дает лучшие результаты по сравнению со стандартным лечением: меньше рецидивов и меньший процент ампутаций.

6. Повторное применение ДЭ при рецидиве трофической язвы у больных СДС эффективно.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал участие в разработке методики использования ДЭ у больных СДС, лично выполнил ее применение у всех пациентов, включенных в исследование; самостоятельно осуществлял наблюдение за больными в ближайшие и отдаленные сроки, исследовал скорость заживления ран, принимал участие в исследовании других параметров. Автор самостоятельно выполнил анализ и статистическую обработку полученных данных.

### **Апробации работы и использование результатов**

Основные положения диссертационного исследования доложены: на региональной научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в лечении ран и раневых инфекций» (Санкт-Петербург, 13–14 ноября 2014); на региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы хирургических инфекций. Особенности лечения трофических язв» (Санкт-Петербург, 11 декабря 2015); на региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения заболеваний у ветеранов Великой Отечественной войны в многопрофильном стационаре» (Санкт-Петербург, 14–15 мая 2015); на международном конгрессе «Раны и раневые инфекции» (Москва, 21–24 ноября 2016); на всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2016» (Санкт-Петербург, 7–8 апреля 2016); на международной научно-практической конференции «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых» (Симферополь, 15–16 мая 2017); на заседании кафедры госпитальной хирургии № 2 совместно с проблемной комиссией «хирургия» ГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ (17 января 2018.)

Способ лечения трофических язв при СДС с применением ДЭ внедрен в работу клиники госпитальной хирургии № 2 ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, отделения гнойной хирургии СПбГБУЗ «Госпиталя для ветеранов войн», отделения лечения хирургических осложнений сахарного диабета СПб ГБУЗ «Городская больница №14».

Результаты научных исследований используются в лекционном курсе и практических занятиях на кафедре госпитальной хирургии № 2 ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, из которых 3 – в изданиях, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который содержит 201 источник: 101 отечественный и 100 зарубежных. Материалы диссертации содержат 20 таблиц и 30 рисунков.



# ГЛАВА 1. ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЭКВИВАЛЕНТОВ КОМПОНЕНТОВ КОЖИ В ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ (ОБЗОР ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Современные представления о патофизиологии раневого процесса

Кожа является самым большим, многофункциональным и анатомически сложным органом. Она осуществляет важную функцию в поддержании жизни человека посредством сохранения терморегуляции и водно-электролитного баланса. Кожа действует как барьер для внешних воздействий, включая микроорганизмы, и представляет собой поле рецепторов различной чувствительности. Исходя из этого, при повреждении ткани запускается процесс заживления, который заканчивается полным восстановлением поврежденных кожных покровов. Классическим вариантом заживления острой раны является сложный, великолепно спланированный динамический процесс, который состоит из четырех этапов: гемостаз, воспаление, пролиферация, ремоделирование, соответственно выделяют фазы воспаления, пролиферации, регенерации [68].

### **Фаза воспаления.**

Является первым этапом на пути к заживлению раны. Под действием тромбоцитарного звена гемостаза и плазменных факторов свертывания и в ране останавливается кровотечение, тем самым начинается процесс заживления раны [57]. Фаза воспаления начинается с активации системы комплемента, который приводит к инфильтрации раны гранулоцитами и полиморфноядерными лейкоцитами (нейтрофилы, ПЯЛ). В течение 24–48 часов после травмы эти клетки мигрируют в область раны за счет действия нескольких агентов (формил-метионил пептидные продукты бактерий, тромбоциты, белок системы комплемента C5a, ТФР  $\beta$ ). Затем ПЯЛ путем диапедеза из крови проникают в окружающие рану ткани, где активно фагоцитируют продукты распада тканей и бактерии, разрушая их лизосомными ферментами, пероксидом и его радикалами. За короткий период жизни ПЯЛ, происходит реализация их основной функции, которая заключается в предотвращении инфицирования тканей раны.

На поздних стадиях фазы воспаления (48–72 ч) число ПЯЛ уменьшается, моноциты мигрируют в область раны. Моноциты приобретают макрофагальный фенотип, продвигаются по градиенту концентрации различных хемоаттрактантов: продукты распада коллагена и эластина, белки систем комплемента и свертывания, фрагменты иммуноглобулина G (IgG), цитокины, такие как ТФР  $\beta$ , ТФР, тромбоцитарный фактор IV, лейкотриен B4 [68].

Макрофаги являются наиболее важными клетками фазы воспаления. Они осуществляют бактерицидную функцию и способны секретировать факторы роста и цитокины, которые

являются необходимыми для фазы пролиферации [68,200]. Помимо того, макрофаги высвобождают протеолитические ферменты, такие как коллагеназы, которые очищают ткани. Истощение тканевых макрофагов и моноцитов приводит к недостаточной ее очистке, создавая серьезные изменения в заживлении раны, а также к задержке пролиферации фибробластов, неадекватному ангиогенезу и фиброзу. Дополнительные факторы роста, такие как ТФР  $\alpha$ , фактор роста фибробластов-2 (fibroblast growth factor, FGF2) и гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста (heparin-binding EGF-like growth factor, HBEGF), которые секретируются макрофагами и ПЯЛ, дополнительно стимулируют воспалительную реакцию.

Через 72 часа в ране появится последний тип клеток фаза воспаления – лимфоциты, которые привлекаются интерлейкином (ИЛ) 1 и IgG. Считается, что ИЛ 1 играет важнейшую роль в регуляции коллагеназы, указывая на то, что лимфоцит вовлечен в ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ) и коллагена. Считается, что лимфоциты в хроническом воспалении играют значительную роль, однако их функция в заживлении ран до сих пор четко не определена [63,68].

В конце фазы воспаления отмечается очищение раны от продуктов распада (если они имелись) и плавный переход в фазу пролиферации. Эта фаза при заживлении раны первичным натяжением, является более короткой и занимает 2–3 суток, но она может длиться более недели при заживлении раны вторичным натяжением и ее нагноении [57].

#### **Фаза пролиферации.**

На следующем этапе улучшаются трофика тканей и процессы микроциркуляции, происходит врастание новых капилляров во вновь образованные ткани, уменьшается отек тканей [57].

Через 3-е суток после возникновения раны начинается фаза пролиферации, которая длится 2 недели и характеризуется замещением предварительной фибрин/фибронектин матрицы на новообразованную грануляционную ткань. На 2–4 сутки в рану мигрируют миофибробласты и фибробласты. Фибробласты начинают синтезировать ВКМ, который состоит из фибриновых элементов (эластин, коллаген I и III типов, ламинин-I, нидоген) и глюкозамингликанов (гиалуроновая кислота, хондроитин сульфат и дерматан сульфат), которые привлекают большое количество натрия и воды. Фибробласты стимулируют выделение цитокинов и факторов роста, оказывающие паракринный и аутокринный эффекты [68,85,199].

Аутокринный эффект фибробластов обеспечивается за счет секреции ряда факторов, таких как ФРСТ, синтез которого, стимулирует ТФР  $\beta$ , который активизирует хемотаксис фибробластов. ФРСТ обеспечивает стимулирующее действие на пролиферацию фибробластов и синтез коллагена.

Обеспечение паракринного эффекта осуществляется секрецией фибробластами ЭФР, ФРК, фактора роста колоний гранулоцитов-макрофагов (granulocyto-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), фактора роста фибробластов 10 (fibroblast growth factor, FGF-10), ИЛ 6. Фибробласты выделяют цитокины, стимулирующие кератиноциты к синтезу компонентов базальной мембраны: коллагена IV и VII типов, перликана, ламинина-5. Взаимодействие между ВКМ и фибробластами определяет синтез и ремоделирование ВКМ.

Новые кровеносные сосуды формируются одновременно на всех этапах процесса заживления. ТФР и ТФР  $\beta$ , которые секретируются тромбоцитами во время фазы гемостаза, привлекают гранулоциты, макрофаги и стимулируют ангиогенез. Макрофаги, играют одну из главных ролей в ангиогенезе, синтезируя ФРФ-2 и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО  $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF  $\alpha$ ). В фибрин/фибронектин раневой сгусток внедряются капиллярные ростки и за несколько дней организуют в грануляционной ткани развитую микроваскулярную сеть. По мере того как коллаген накапливается в грануляционной ткани, уменьшается плотность кровеносных сосудов. Нарушение баланса в этом динамическом процессе приводит к замедлению заживления ран.

Грануляционную ткань составляют в основном из пролиферирующие фибробласты, капилляры и тканевые макрофаги в матриксе из коллагена, гликозамингликанов, гиалуронана, фибронектина и тенасцина. Уже через 48 часов после ранения происходит синтез грануляций в ране, а через 96 часов преобладающим типом клеток становятся фибробласты.

Кератиноциты осуществляют процесс эпителизации, и управляют неоангиогенезом, экспрессируя VEGF [68,200]. За счет развитой сети капилляров фибробласты обеспечиваются питанием и кислородом, тем самым стимулируется рост клеток и поддерживается синтез матрицы раны. Постепенно уменьшается отек и экссудация, грануляционная ткань заполняет весь раневой дефект [68].

Отдельные слои кератиноцитов начинают мигрировать с краев раны уже в первые несколько часов после ранения. Примерно через 12 часов после образования раны отмечается повышение митотической активности в базальных клетках краев раны и вокруг придатков кожи под воздействием таких факторов роста, как ЭФР, основной ФРК, ФРФ. Процесс пролиферации кератиноцитов завершается путем контактного торможения, после чего начинается синтез базальной мембраны. Если не повреждена базальная мембрана, рана не требует хирургической обработки, сохранена влажная среда, скорость покрытия эпидермисом возрастает. Дальнейший рост и дифференцировка эпителиальных клеток приводит к восстановлению многослойного эпидермиса. [68].

**Фаза регенерации (ремоделирования).**

При заживлении раны первичным натяжением или под струпом, происходит эпителизация раны путем миграции эпителия с краев раны. При заживлении раны вторичным натяжением происходит формирование грубого соединительнотканного рубца [57].

Эта стадия процесса заживления наиболее продолжительна по времени и начинается с формирования грануляционной ткани. В процессе созревания матрикса количество фибронектина и гиалуроната уменьшается, а пучки коллагеновых волокон увеличиваются в диаметре, способствуя повышению прочности на разрыв раны.

Ремоделирование представляет собой тонкое равновесие между синтезом и разрушением тканей. Оно контролируется активностью протеолитических ферментов, главным образом, матриксными металлопротеиназами (ММП; matrix metalloproteinases, MMPs) и их природными тканевыми ингибиторами. Коллагеназы и другие ММП приводят к деградации коллагена I и III типов, который присутствует в коже в пропорции 4:1.

Вначале коллаген откладывается в ране неструктурированно. Затем стягивание раны осуществляется за счет взаимодействия ВКМ и фибробластов, на которое оказывает влияние ряд факторов, таких как ТФР  $\beta$ , ТФР и ФРФ. Организованный порядок фибрилл и прочность ткани обеспечивает стягивание раны. Со временем численность фибробластов и макрофагов уменьшается путем апоптоза, который происходит по неизвестным причинам [20,68,109]. Предполагают, что апоптоз может быть вызван высвобождением определенных факторов реэпителизации и цитокинов или дифференцировкой миофибробластов. Затем происходит остановка роста капилляров в процессе ремоделирования, приводящая к уменьшению метаболической активности в области раны. Рубец без и сосудов и клеток является финальным результатом процесса заживления острой раны. Процесс восстановления кожи является чувствительным к воздействиям разного характера, и часто в ране может быть отмечено замедление заживления при длительном воздействии неблагоприятных местных и системных факторов. По мнению американского Общества лечения ран (Wound Healing Society) рану, на проходящую в течение 3 месяцев через упорядоченный и своевременный путь, направленный на получение анатомической и функциональной целостности кожных покровов, считают хронической [68].

## **1.2. Факторы, нарушающие процесс заживления ран у больных сахарным диабетом**

В последнее время нарушения, возникающие при заживлении кожных покровов у больных с СД, признают отдельным фактором, определяющим вероятность и сроки излечения пациента с СДС [23]. Улучшение понимания и коррекция клеточных, молекулярных и биохимических нарушений в хронической ране в сочетании с соблюдением стандартов лечения СДС дают новую надежду в решении проблемы заживления язв при СД [38,68,110].

Хотя заживление ран при СД протекает по тем же законам и имеет те же фазы, что у лиц без СД, но отмечается склонность к хронизации процесса [37]. На процесс заживления язвенных дефектов при СД оказывает влияние множество факторов [4,54].

Считается, что адекватная и своевременная терапия СДС в подавляющем большинстве случаев обеспечивает заживление трофических язв в оптимальные сроки и тем самым снижает риск ампутации нижней конечности. Тем не менее, проблема лечения СДС сохраняет свою актуальность и в настоящее время. К причинам этого, прежде всего, относят недостаточное выполнение пациентами рекомендаций врача и отступления, которые в ходе терапии сделаны медицинским персоналом. Как показали научные исследования, наибольшую проблему для больных представляет длительное соблюдение режима разгрузки конечности [93]. При этом у язвы «не отвечают» на адекватную стандартную терапию 15–20 % пациентов с СДС (динамика площади раны к концу 4-й недели менее чем на 50 %) и имеют риск осложнений в результате присоединения инфекции. Данный феномен объясняется тем, что заживление трофических язв при СД происходит с участием клеток с измененным фенотипом, при наличии отклонений в экспрессии и активности цитокинов и факторов роста, которые необходимы для координации процесса заживления [68].

Гипергликемия является не только основным патогенетическим фактором развития СДС, а также оказывает отрицательное влияние на регенеративные возможности кожных покровов. Негативное воздействие гипергликемии на заживление трофических язв основано на эффекте конечных продуктов гликирования, которые индуцируют продукцию факторов воспаления (ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1) и нарушают синтез коллагена фибробластами [59,68,79,110].

Высокое содержание глюкозы в крови может привести к изменениям в клеточной морфологии, неправильной дифференциации и снижению пролиферации кератиноцитов. На фоне длительно разрегулированного СД происходят изменения в иммунной системе: уменьшение количества лимфоцитов и лейкоцитов, нарушение основных функций у макрофагов и нейтрофилов, в том числе адгезия, хемотаксис и фагоцитоз, редукция бактерицидной способности, уменьшение адгезии ПЯЛ и снижение функции апоптоза [123]. Известно, что у пациентов с декомпенсированным СД имеет место увеличение выделения провоспалительных цитокинов (ИЛ 6, ИЛ 8, ФНО  $\alpha$ , активных форм кислорода) и уменьшение секреции эндотелиального оксида азота, что способствует вазоконстрикции [68,142].

Резко повышает риск инфицирования раны при снижении активности иммунной системы, при возникновении которого макрофаги и нейтрофилы в избытке выделяют оксиданты и ММП [68].

Повышение уровня провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода также приводит к увеличению концентрации ММП в раневой жидкости, что вызывает постоянный

оборот ткани, который приводит к расщеплению и распаду компонентов ВКМ и, следовательно, замедляя заживление раны. Кроме того, ММП способны разрушать цитокины и факторы роста, которые необходимы для заживления раны [68,89].

В результате недостаточная продукция цитокинов приводит к хронизации раневого процесса в процессе рубцевания, а чрезмерная продукция — к образованию гипертрофического рубца [86].

Известно, что цитокины, которые содержатся в раневой жидкости длительно незаживающей трофической язве, ингибируют рост и способствуют морфологическим изменениям нормальных фибробластов кожи. Фибробласты хронических ран описаны в литературе как широкие большие полигональные клетки и отличаются от компактных и веретенообразных фибробластов острых ран [68].

При СДС фибробласты могут быть по фенотипу «старейшими», демонстрировать низкий ответ на ТФР  $\beta$  и ТФР, миграционную и пролиферативную способность, а также склонность к апоптозу [68,146].

В длительно незаживающих ранах низкая интенсивность реэпителизации связана с резким снижением скорости миграции и пролиферации кератиноцитов [133]. Многие факторы влияют на скорость миграции кератиноцитов, к основным из которых относят состав матрикса и активность цитокинов, которые выделяют макрофаги и фибробласты в раневую среду. При острых ранах мигрирующие кератиноциты экспрессируют  $\alpha 5\beta 1$ -интегрин. Его уровень снижен в длительно незаживающих ранах, кератиноциты имеют немигрирующие фенотипы [68,136,189].

Большие размеры трофических язв (диаметр более 2 см<sup>2</sup>) также определяют сроки полного заживления. Кроме того, при воздействии на такую рану нагрузки в фазе ремоделирования происходит более активная дифференцировка фибробластов в миофибробласты, которые характеризуются измененным синтезом фибронектина и гликозаминогликанов, повышенным синтезом ТФР  $\beta 1$ , ТФР  $\beta 2$ , коллагена I типа и рецептора ИПФР-II / манноза 6-фосфата. Миофибробласты вызывают перерождение кератиноцитов, способствуя склерозу тканей и образованию гипертрофических рубцов, в дальнейшем на месте которых у пациентов с СД возникают рецидивы трофических язв [68].

Отрицательное влияние на репаративные процессы оказывают и другие факторы, в частности, печеночная, почечная и сердечная недостаточность, в результате чего появляются околораневые отеки, кожные покровы становятся подвержены бактериальной инфекции. Почечная недостаточность приводит к накоплению конечных продуктов обмена веществ и замедляет процессы репарации ткани [4].

У больных с СД наряду с общими факторами, препятствующими заживлению ран, имеются факторы, связанные с формой СДС.

При нейропатической форме СДС отмечается автономная нейропатия, которая приводит к денервации сосудистой стенки и формированию артериовенозных шунтов. В результате артерии мелкого и среднего калибра теряют возможность к дополнительному расширению и соответственно – к обеспечению очага воспаления необходимыми питательными веществами и кислородом. Кроме того, наличие сенсомоторной нейропатии ухудшает восприятие и оценку пациентом признаков инфекции, что отрицательно сказывается на своевременности оказания медицинской помощи [4,26].

У больных с нейро-ишемической формой СДС происходит нарушение магистрального кровотока в артериях нижних конечностей и приводит к ишемии тканей, создавая условия для последующего инфицирования язв с отсутствием возможности развития адекватной воспалительной реакции. К тому же в условия воспаления возникает отек тканей, который дополнительно сдавливает окклюзированные артерии и усугубляет ишемию. Недостаточная оксигенация тканей приводит к нарушению функциональной способности лейкоцитов, снижение выработки коллагена и замедлению эпителизации. Созревание грануляционной ткани требует хорошего кровоснабжения. При ишемии поступление в ложе раны макрофагов и фибробластов прекращается, что приводит к замедлению регенерации ткани [4].

Перечисленные выше обстоятельства указывают на резкое снижение возможностей диабетических язв к спонтанному заживлению и ведущую роль этого функционального состояния клеток раневой поверхности и состава раневого экссудата. Это делает процесс заживления таких трофических язв сложной клинической задачей, требует применения комплекса разнообразных мер и предполагает обязательное воздействие на регенеративный потенциал местных тканей.

### **1.3. Общая характеристика современных методов лечения трофических язв при синдроме диабетической стопы**

Основные принципы лечения трофических язв при СДС:

- 1.3.1. Снижение внешнего давления и защита язв от повреждения;
- 1.3.2. Восстановление кожного перфузионного давления;
- 1.3.3. Устранение инфекции;
- 1.3.4. Метаболический контроль и лечение сопутствующих заболеваний;
- 1.3.5. Местное лечение язв [6,17,151].

### 1.3.1. Снижение внешнего давления и защита трофических язв от повреждения

Важность полноценной разгрузки конечности при лечении СДС трудно переоценить [35,83]. Не случайно во всех стандартах лечения СДС этот вид специализированной помощи стоит на первом месте. Применение самых современных перевязочных средств, антибиотиков широкого спектра действия, как правило, оказывается недостаточным для эффективного лечения СДС, если не обеспечивается главное условие – снятие (или перераспределение) внешнего давления с пораженной стопы [4,32]. Даже оптимальный уход за раной не сможет компенсировать постоянное травмирование, вследствие механической нагрузки [17].

Существуют следующие виды разгрузки конечности: постельный режим, кресло-каталка, костыли, разгрузочный полуботинок, индивидуальная разгрузочная повязка (ИРП) и заменители ИРП (модулярные ортопедические аппараты, касты и ортезы). У каждого из этих видов имеются свои преимущества и недостатки [4].

При соблюдении больным СДС постельного режима, безусловно, удастся достичь 100 % разгрузки конечности. Но на практике это трудновыполнимая задача, так как для полной эпителизации язвенного дефекта стоп необходимо длительное время – от нескольких недель до многих месяцев [126].

Использование кресла-каталки также позволяет достичь полноценной разгрузки конечности. Кресло-каталку наиболее эффективно можно использовать в условиях стационара.

Наиболее распространенным способом разгрузки стопы в амбулаторных условиях является использование разгрузочного полуботинка. К несомненным достоинствам относится его доступность: изделие можно свободно приобрести во многих ортопедических мастерских или салонах по приемлемой цене и индивидуальному подбору. Это делает его привлекательным для большей части пациентов. Главным недостатком этого вида разгрузки – неспособность разгрузить среднюю часть стопы. Также имеются ограничения при ношении изделия на улице, особенно в зимнее время года [4,115].

На сегодняшний день «золотым стандартом» разгрузки конечности является индивидуальная разгрузочная повязка, которая изготавливается из полимерных материалов [169]. Существуют несколько модификаций ИРП: ИРП на голень и стопу, ИРП на стопу. Применение той или иной повязки определяется особенностью язвенного дефекта и приверженностью больного к назначенному лечению. Эффективность и преимущество перед другими методами разгрузки лечения СДС с помощью ИРП доказана в многочисленных контролируемых исследованиях [105,125,131,192]. Основным механизмом действия ИРП на голень и стопу является перераспределение нагрузки с передних отделов стопы на пяточную область и голень [4]. Уменьшение отека голени и стопы благодаря компрессионному действию



повязки способствует сокращению сроков заживления язв. ИРП может применяться в виде съемного и несъемного вариантов, вопрос о варианте ИРП решается врачом индивидуально для каждого пациента [4].

Заменители ИРП представлены готовыми модульными ортопедическими аппаратами, в состав которых входят шины для фиксации голеностопного сустава, ригидная подошва с приподнятой пяточной областью и передней частью Эйркаст, Блэдсоу Конформер. Подобная конструкция позволяет исключить пережат и способствует равномерному перераспределению давления по подошвенной поверхности пораженной стопы. Так как изделие съемное, есть возможность частого контроля состояния раны. Ограничивает их применение высокая цена [4].

### **1.3.2. Восстановление кожного перфузионного давления**

Пациентам с нейроишемической формой СДС, у которых имеются признаки критической ишемии: систолическое АД на лодыжке  $< 50$  мм рт. ст. или ЛПИ  $< 0,5$ , если пальцевое давление  $< 30$  мм рт. ст. или  $TspO_2 < 25$  мм рт. ст. после визуализации артериального русла (ультразвуковое ангиосканирование, традиционная/МСКТ или МРТ ангиография) сосудов нижних конечностей, при возможности выполняют реваскуляризацию артерий нижних конечностей [170,190]. Цель реваскуляризации состоит в восстановлении прямого кровотока по крайней мере в одной из артерий стопы, желательно в артерии, кровоснабжающей анатомическую область раневого дефекта [16,17,40,61].

К основным методам хирургического лечения критической ишемии конечностей относятся реконструктивные сосудистые операции. Которые делятся на «открытые»: шунтирование, эндартерэктомия, протезирование; и эндоваскулярные вмешательства: чрезкожная баллонная ангиопластика (самостоятельная или в сочетании с установкой эндоваскулярного стента) [27,60].

Выбор техники реваскуляризации основан как на индивидуальных факторах (таких как морфологическое распределение заболеваний периферических артерий, доступность аутогенной вены, сопутствующие заболевания), так и на наличие ресурсов и квалифицированного персонала [17].

Пациентам, которым не удалось выполнить реваскуляризацию, применяют фармакологическую терапию. Для улучшения артериального кровотока применяют Простогландин E1. Этот препарат обладает сосудорасширяющим и ангиопротективным эффектами, за счет повышения деформированности эритроцитов улучшает реологические свойства крови, обладая фибринолитическим эффектом, способен уменьшать адгезию и агрегацию тромбоцитов [9,27,41]. В комплексной терапии ишемической и нейроишемической форм СДС с хорошим эффектом применяют гепариноиды или гепаринсульфаты [27].

Вспомогательную роль в улучшении кровоснабжения тканей при СДС оказывает применение методов фотомодификации крови (внутрисосудистое лазерное/ультрафиолетовое облучение аутокрови, магнитотерапия), улучшающих реологические свойства крови, повышающих сродство гемоглобина к кислороду и способствующих снижению эндотелиальной дисфункции. Применяют также оксигаротерапию [14,81,82,91].

В последние годы с целью улучшения перфузии тканей при СДС также изучается возможность использования различных способов новой технологии – «терапевтического ангиогенеза» (клеточная терапия, генная терапия – «неоваскулген»), направленной на создание нового микрососудистого русла в зоне ишемии. Неоваскулген® является оригинальным инновационным, «первым в классе», российским геннотерапевтическим препаратом, механизм действия которого называют терапевтическим ангиогенезом. Данный препарат разработан ОАО «ИСКЧ» для лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза, представляет собой кольцевую ДНК (плазмиду), несущую человеческий ген VEGF 165, который кодирует синтез фактора роста эндотелия сосудов (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor). Неоваскулген® способен стимулировать синтез и рост коллатеральных сосудов, призван оказывать длительный терапевтический эффект, тем самым способный улучшать качество жизни пациентов. В ишемизированной ткани нижней конечности развитие микроциркуляторного русла способствует насыщению тканей кислородом, эпителизации язв, увеличению дистанционной безболевого ходьбы. По данным клинических исследований, после курса Неоваскулгена® терапевтический эффект сохраняется до 3 лет, но предполагают, что эффект может быть более длительным[12,15,56,98,149,176].

### 1.3.3. Устранение инфекции

В настоящее время для любой хронической раны (трофической язвы) принята стратегия ведения – «Wound Bed Preparation». Это стратегия обработки основания раны с целью перевода хронической раны в острую и удаления как некротически измененных тканей, так и фенотипически измененных клеток края и основания раны и продуцируемого ими экссудата. Условно тактические действия соответствуют акрониму «TIME»: Т – tissue management (обработка дна раны); I – inflammation and infection control (контроль инфекции и воспаления); М – moisture balance (контроль экссудации); Е – epithelial (edge) advancement (контроль состояния краев раны, стимуляция эпителизации) [95].

«Т» – tissue management (обработка дна раны).

Способствует переводу хронической раны в острую именно обработка дна раны. Она лежит в основе активации эндогенных процессов регенерации тканей. Целый ряд причин диктует необходимость подобной агрессивной обработки. Прежде всего, потенциальным

субстратом развития инфекционных осложнений являются некротически измененные ткани и пленки фибрина. Кроме того, клеточные линии, которые находятся в крае хронической раны, претерпевают фенотипическую трансформацию, которая ведет к нарушению процессов регенерации [95]. В последние годы также возникло понимание, что инфекция в хронической ране образует биопленку, защищающую её при применении лечебных средств.

Поэтому для элиминации инфекции из хронической раны используют дебридмент раны и различные методы, подавляющие рост и развитие микрофлоры раны и разрушающие биопленку. [95]. В последние годы наряду с классической хирургической обработкой раны применяют новые технологии (ультразвуковую кавитацию, гидрохирургический дебридмент, биологическую некрэктомию, использование антисептиков, обладающих поверхностно-активным эффектом, разрушающим биопленку, вакуумтерапию) [62,95].

Ультразвуковая кавитация трофической язвы – это метод, который основан на местном применении низкочастотного ультразвука и позволяет совместить процесс механической очистки раны с антибактериальным действием. При использовании ультразвука возможно проведение щадящей некрэктомии при обработке трофической язвы. Глубокая дезинфекция трофической язвы, благодаря бактерицидному действию ультразвука, в сочетании с активным дренажом трофической язвы способствует более быстрому ее очищению. Помимо этого, отсутствие местного раздражающего действия и безболезненность обработки следует также отнести к несомненным преимуществам ультразвуковой кавитации. Ультразвуковая кавитация способствует сокращению длительности экссудативной фазы и ускоряет переход раны в фазу пролиферации, позволяет снизить частоту инфекционных осложнений и, как следствие, необходимость госпитализаций и хирургических вмешательств [52,95,77].

Применение гидрохирургического скальпеля VERSAJET основана на том, что система подает высокоскоростной поток жидкости, позволяющий одновременно очищать рану и обрабатывать пульсирующей струей. Создается локальный вакуум, который удаляет детрит, фрагменты ткани и жидкое содержимое [55,80,93,95].

Биологическая некрэктомия проводится с использованием стерильных личинок зеленой бутылочной мухи и обеспечивает высоко селективную некрэктомию [95].

Обсуждая вопрос хирургической обработки раны, нельзя не упомянуть проблему биопленок. Биопленкой является сообщество микроорганизмов разных видов, которые живут в трехмерном межклеточном мукополисахаридном матриксе [88,96]. При формировании биопленки в условиях раневого дефекта происходит развитие хронического воспаления и замедляются процессы заживления [111,112,113,118,196]. Ишемия и иммунодефицит способствуют формированию биопленок при СД. Таким образом, СД рассматривают как состояние, предрасполагающее к образованию биопленок. [95].

Бактериальные биопленки являются устойчивыми к антибактериальным агентам, тем самым создают основную клиническую проблему. Формирование мукополисахаридного матрикса затрудняет проникновение биоцидов к бактериям, стандартные пероральные дозы антибиотиков оказываются не эффективными [95,139,147].

Адекватное удаление и препятствие реконструкции биопленок являются основными принципами воздействия на них. Особое внимание уделяется применению современных биоцидов, причем предпочтение отдается не просто антибактериальным препаратам, а агентам, способным разрушать биопленки [172]. Примером является раствор Пронтосан, который содержит поверхностно-активный и антибактериальный компоненты, обеспечивая антибактериальное действие и способствуя разрушению биопленок [95].

«I» – inflammation and infection control (контроль инфекции и воспаления).

Любая хроническая рана является, как минимум, контаминированной или поверхностно колонизированной. Критическая колонизация или явная инфекция – два состояния, которые требуют местного применения средств с антибактериальным компонентом. Диагноз местной инфекции устанавливается на основании совокупности клинических признаков воспаления и результатов микробиологического исследования (микробная обсемененность раневой поверхности более  $10^5$  на 1 мл отделяемого). Признаки выраженной инфекции, требующей назначения системной антибактериальной терапии: местное абсцедирование с формированием трактов и затрудненным оттоком гноя, обильное гнойное отделяемое, температура тела более  $38^{\circ}\text{C}$ , ЧСС больше 90 в минуту, лейкоцитоз более 12000/л [50]. Высокая микробная обсемененность имеет очень большое клиническое значение, так как способствует замедлению процессов репарации и приводит к хронизации раневого процесса [95].

При поверхностных язвах с инфекцией кожных покровов легкой степени назначают пероральную антибиотикотерапию, направленную против *St.aureus* и стрептококков (если нет причин предполагать наличие других возбудителей) [17].

«M» – moisture balance (контроль экссудации).

Поддержание влажной среды в ране – является основополагающим моментом заживления любой хронической раны. Избыточная экссудация приводит к мацерации прераневой зоны и увеличивает риск инфекций, способствует увеличению размера раны и замедляет заживление. Избыточное отведение экссудата может способствовать высыханию раны, гибели эпителия и замедлению заживления, развитию некроза[95].

Революционным подходом в местной терапии трофических язв можно считать использование вакуумной терапии. Вакуумная терапия (NPWT или VAC-Therapy) местное пролонгированное использование локального отрицательного давления (Renasys Go, Renasys EZ, PICO, Vivano Tec). В основе данной методики лежит применение специальных губчатых

повязок и вакуумного генератора, что позволяет создать отрицательное давление в трофической язве [24,53,78]. Среди положительных эффектов следует отметить: позволяет создать отрицательное давление в ране, обеспечивает удаление излишков экссудата, уменьшает бактериальную обсемененность раны, стимулирует рост грануляционной ткани и эпителия, сохраняет и поддерживает влажную среду, снижает локальный интерстициальный отек тканей, усиливает транскапиллярный транспорт, стимулирует неоваскулогенез, уменьшает площадь раны (сближение краев независимо от клеточной пролиферации) [10,73,76,78,110].

Возможно поддержание как постоянного, так и прерывистого режима воздействия отрицательного давления на рану[97].

#### **1.3.4. Метаболический контроль и лечение сопутствующих заболеваний**

Компенсация гипергликемии является одним из важных компонентов в лечении язвенных дефектов при СДС. Без адекватного метаболического контроля достичь положительного результата невозможно [9,27,130]. Наиболее целесообразен перевод больного на интенсифицированную инсулинотерапию: инъекции инсулина короткого действия перед завтраком, обедом и ужином и пролонгированного действия перед завтраком и перед сном [39]. Ввиду того, что 1 г гноя может инактивировать до 15 ЕД инсулина, ведение больного с язвой стопы на пероральных сахароснижающих препаратах может быть затруднено из-за лабильного течения диабета [27].

Пациентам с СДС также необходимо лечение отеков нижних конечностей вследствие варикозной и посттромбофлебитической болезни нижних конечностей или хронической сердечной недостаточности, и корректировать недостаточность питания [17].

#### **1.3.5. Современные принципы местного лечение трофических язв при синдроме диабетической стопы**

Современная концепция местного лечения любых хронических ран базируется на необходимости дебридмента дна и краев раны (wound bed preparation) и ведения ее во влажной среде за счет дифференцированного применения различных по механизму действия и составу перевязочных средств (интерактивных раневых покрытий) в соответствии с фазой раневого процесса, степенью экссудации, характером некроза, глубиной и объёмом поражения [27,82].

Кроме того, все перевязочные средства должны обеспечивать, хороший газообмен, быть атравматичны в применении и непроницаемыми для бактерий [4,27,33].

В фазе **воспаления** главная задача – очищение полости или поверхности раны от некротических масс и экссудата. Поэтому, необходимо применение перевязочных средств с высокой впитывающей способностью и антимикробной активностью. Антимикробный

компонент в перевязочном средстве может быть представлен антибиотиком, сульфаниламидом, йод-повидоном. В последнее время возрос интерес к использованию в качестве антимикробного компонента ионов серебра, которое содержится в большинстве современных перевязочных средств последнего поколения.

Поставленным задачам для этой фазы в полной мере соответствуют такие перевязочные средства, как:

1. *Многокомпонентные мази на водорастворимой основе.* Отличительной особенностью которых является наличие в составе антимикробного компонента и гидрофильной основы. Они обладают выраженным дегидротационным эффектом, образуют с антимикробным компонентом комплексные соединения и транспортируют их в глубину раны, в места скопления микроорганизмов.

2. *Сетчатые раневые покрытия с антимикробным компонентом.* Одно из главных преимуществ этих покрытий – их атравматичность. Как правило, сетчатые раневые покрытия содержат мазевую гидрофильную основу и антимикробный компонент, в частности йод-повидон.

3. *Адсорбирующие раневые покрытия, содержащие активированный уголь.* Данные перевязочные средства обладают мощным адсорбирующим действием, так как содержат осмотически активный компонент – активированный уголь.

4. *Альгинатные раневые покрытия.* Альгинаты представляют собой гидрофильный полимер в форме волокон, получаемый из морских водорослей. Они могут содержать соли кальция и натрия альгиниевой кислоты (alginic acid), входящей в состав бурых морских водорослей. При контакте с солями натрия, находящимися в крови и раневом секрете, волокна повязки набухают и превращаются во влажный гигроскопичный гель, впитывающий большой объем секрета и не прилипающий к ране. Ввиду тесного контакта с раневой поверхностью бактерии поглощаются отовсюду, в том числе из глубины ран и карманов. Гелеобразная консистенция создает эффект влажной среды, препятствуя высыханию раны, что позволяет безболезненно осуществлять смену повязки [67,173,195].

В фазе **репарации** перевязочные средства должны обеспечивать оптимальную влажность в ране, но не должно быть избыточного экссудата, так как это может привести к вторичному инфицированию, мацерации окружающих тканей и в конечном итоге к замедлению процессов заживления. Также рана не должна быть сухой и покрываться коркой. Таким образом, перевязочное средство должно обладать способностью, как поглощать избыточный экссудат, так и увлажнять рану дозированным количеством жидкости. Кроме того, для защиты нежной грануляционной ткани повязка должна быть атравматичной с возможной редкой сменой. Вышеуказанными свойствами обладают:

1. *Гидрогели*. Они представляют смесь полимеров с водой, составляющей до 90 % массы повязки. Гидрогели, обеспечивая влажное заживление раны, способствуют аутолитическому очищению раневой поверхности. Это приводит к ускорению времени заживления и предотвращения образования рубца.

2. *Гидроколлоиды*. Они представляют собой самофиксирующиеся повязки с полупроницаемым верхним слоем. Гидроколлоидная повязка состоит из целлюлозы, желатина и пектинов на полиуретановой пленке. При поглощении раневого отделяемого гидроколлоидные компоненты повязки набухают и переходят в гель, который поддерживает в ране влажную среду. При этом, до тех пор пока гидроколлоиды не насыщаются, гель сохраняет всасывающую способность. Насыщение гидроколлоидов проявляется деформацией повязки в виде пузыря, что служит основанием для ее смены. Гидроколлоидные повязки поддерживают влажную среду в ране, потенцируют аутолитическое очищение ран, стимулируют процессы грануляции и эпителизации и характеризуются достаточной атравматичностью.

3. *Гидрополимеры*. Они имеют сложную структуру. В их состав входит слой гидрополимера, суперпоглотитель (акрилат с волокнами шелка и вискозы) и слой вспененного полиуретана. Подобный состав способен поглощать большее количество влаги и удерживать ее. При этом риск мацерации сведен к минимуму.

В фазе **эпителизации** повязка выполняет по большей части те же функции, что и в предыдущей фазе: зрелые грануляции и влажная поверхность раны – необходимые условия для итоговой эпителизации. Данные повязки должны также поддерживать в ране влажную среду. Эпителиальные клетки гибнут, если в ране накапливается избыточный экссудат. Если рана чрезмерно сухая, образуется корка, которая сдерживает эпителизацию. Таким образом, и в эту фазу также требуются гидроактивные, атравматические раневые повязки, защищающие раневую поверхность от высыхания, а эпителиальные клетки – от травматизации при смене повязки и присоединения вторичной инфекции [4].

Разработаны препараты местного действия, которые содержат факторы роста: Регранекс® является препаратом рекомбинантного человеческого тромбоцитарного фактора роста, Эбермин®, Биоплен-ЭФР®. В 2006 году был создан препарат Эберпрот-П® на основе эпидермального фактора роста, получивший разрешение к применению на территории Российской Федерации в 2014 году. Местная инфильтрация Эберпрот-П® стимулирует пролиферацию и дифференцировку фибробластов, эндотелиальных клеток и кератиноцитов, а введение препарата непосредственно в ткани позволяет избежать воздействия протеаз, обеспечить взаимодействие эпидермального фактора роста с рецептором [15,34,163,167].

Концепция лечения хронических ран во влажной среде с обработкой (дебридментом) дна раны и использованием современных интерактивных раневых покрытий существенно

улучшили результаты заживления трофических язв [62]. Однако, заживление диабетических трофических язв идет очень медленно и не всегда успешно. Сроки заживления трофических язв у большинства пациентов составляют в среднем около 2–3 месяцев, у ряда пациентов они не заживают годами, а частота рецидивов достигает 60–70 % при консервативном лечении. Недостаточная эффективность существующих консервативных методов лечения и большая распространенность трофических язв приводят к огромному экономическому ущербу, вызванному потерей нетрудоспособности [85].

Одним из методов лечения, направленных на сокращение сроков заживления хронических ран, является аутодермопластика свободным расщепленным лоскутом [2, 49,71]. Однако, по данным литературы, применение этого метода для закрытия язвенных дефектов при СДС не всегда технически возможно (особенно на определенных отделах стопы) и успешно [21,33,66,101]. Риск неприживляемости трансплантата при этом, по данным различных авторов составляет 10–30 % [33]. Кроме того, на фоне диабетической полинейропатии, микро- и макроангиопатии высок риск образования дополнительного хронического раневого дефекта в области взятия кожного лоскута [85]. Так, по данным различных авторов, эпителизация донорских участков осложняется нагноением и длительным заживлением в 5–70 % случаев [19,101]. При этом длительное заживление донорских ран ведёт к образованию гипертрофических и келоидных рубцов [19].

В связи с недостаточной эффективностью традиционных подходов к лечению диабетических трофических язв идет поиск новых лечебных средств, направленных на сокращение скорости заживления раневого дефекта. С этой целью в последнее время широко изучается перспектива применения клеточной терапии и продуктов клеточных технологий, в частности, биотехнологических эквивалентов компонентов кожи [85].

#### **1.4. Биотехнологические эквиваленты компонентов кожи**

Применение клеточных технологий в лечении острых и хронических ран, ожогов диабетических язв является важнейшим и быстро развивающимся направлением современной регенераторной медицины. Задача тканевой инженерии при этом заключается не только в трансплантации живых клеток в область язвенного дефекта, но и в полном восстановлении структуры и функции кожного покрова, в стимуляции процессов регенерации и формирования микроокружения для реализации потенциала собственных тканей и клеток. Для решения этих задач используют методы клеточных технологий [92].



### 1.4.1. История местного применения клеточных культур для заживления ран

Идею о необходимости применения культивируемых *in vitro* кератиноцитов для лечения ран впервые высказал Р. Medawar (1948). Работы в этом направлении продвигались медленно в связи с значительными трудностями, которые были связаны с культивированием клеток в больших масштабах [13,33].

J. Rheinwald, H. Green (1975) разработали технологию серийного выращивания больших количеств кератиноцитов человека [102,175]. Эта технология позволяет в короткие сроки вырастить эпителиальные пласты, в сотни и тысячи раз превышающие размер исходного лоскута кожи [168]. С начала кератиноциты выращивали, используя фидерные клетки – мышинные фибробласты линии 3T3 Swiss. В дальнейшем фидерные клетки заменили добавлением в культуральную среду белков внеклеточного матрикса и факторов роста. Оказалось, что их можно использовать в качестве субстратов для культивирования, так как некоторые из них способствуют росту кератиноцитов [92].

Главным недостатком многослойных пластов кератиноцитов в качестве эквивалента кожи считается отсутствие дермального слоя [70].

В 1981 году были опубликованы сведения о создании живого эквивалента кожи [70]. Исследователи из Массачусетского технологического института и Гарвардской медицинской школы разработали субстанцию, которая представляла собой коллагеновый гель, включающий культивированные фибробласты, а сверху покрытые культурой кератиноцитов [104,193]. Последующие публикации были посвящены клиническому применению живого эквивалента кожи и свидетельствовали о его перспективном применении в лечении ран и ожогов [104,182,12].

Необходимо отметить, что первые попытки применения культивируемых *in vitro* клеток кожи и большинство дальнейших исследований в этом направлении, были разработаны и применены как метод восстановления кожного покрова у обожженных [29,94]. Скорейшее восстановление кожного покрова на больших площадях ожоговых ран у тяжелообожженных, является одной из основных задач комбустиологии [87]. Трудноразрешимой задачей в лечении ожогов, является недостаток донорских ресурсов, тем самым препятствуя улучшению лечения обожженных. Существующие до последнего времени биологические и синтетические материалы могли быть применены только как временные раневые покрытия на этапах аутодермопластики. Поэтому, получение клеток *In vitro* и их трансплантация на ожоговые поверхности ознаменовали новый подход к решению указанных проблем [1].

В нашей стране в отделении патологической анатомии и центре термических поражений Института хирургии им. А.В. Вишневского РАМН под руководством академика Д.С. Саркисова

в начале 90-х годов прошлого века был разработан метод лечения ожоговых ран с использованием культивированных фибробластов [30,31]. В.П. Туманов и соавт., анализируя 10-летний опыт применения культивированных аллогенных ФБ для лечения термических ожогов, отмечают высокую эффективность этого метода лечения у 333 обожженных. Сочетание быстроты получения трансплантата (1–3 суток) с высоким процентом его приживления (96 %), учитывая выраженный ранозаживляющий эффект, делает этот метод, по мнению авторов, одним из наиболее перспективных в комбустиологии [94].

Трансплантация культивированных аллогенных фибробластов находит также своё применение для заживления донорских участков после забора кожи для аутодермопластики [48]. Применение пересадок фибробластов привело к ускорению эпителизации и изменению структуры неэпителия (отмечалась более ранняя дифференциация слоев), по сравнению с изолированной аутодермопластикой [87].

Перспективы использования фетальных фибробластов человека при лечении длительно незаживающих ран различной этиологии представлены в работах Т.Д. Колокольцовой и соавторов [69]. Монослой фибробластов легкого эмбриона человека, выращенный на подложке, переносили на раны после ожога, отморожения, нагноения донорских участков и при флегмоне голени. Донорская рана, которая длительно не заживала и периодически нагнаивалась, на третьи сутки после трансплантации клеток очистилась от гноя, в ней усилилась краевая эпителизация, на восьмые сутки дефект полностью заживал [69]. Аналогичный результат достигнут и в других наблюдениях: раны эпителизовались на восьмые сутки [177,178].

В последние годы с целью ускорения заживления хронических ран получило нанесение на ее поверхность **богатой тромбоцитами аутоплазмы (БоТП)**. Использование концентрированной суспензии тромбоцитов основано на высвобождении из них в результате дегрануляции основных регуляторов процессов репарации, источников факторов роста, которые привлекают в область повреждения прогениторные клетки, усиливая активность пролиферации, обеспечивая неангиогенез и усиление эпителизации. Доказано, что применение БоТП в комплексном лечении венозных трофических язв обеспечивает широкий спектр системных и местных лечебных эффектов, улучшающих результаты и сроки лечения [15,22,103,155].

Таким образом, показано, что местное применение различных клеточных культур оказывает выраженный стимулирующий эффект на заживление ран и ожоговых поверхностей: улучшаются клинические показатели течения раневого процесса, сокращаются сроки заживления ран. Следовательно, сокращаются сроки лечения, снижаются материальные затраты [2,51]. Особую ценность использование клеточных технологий представляют для лечения длительно незаживающих трофических язв.

### 1.4.2. Бесклеточные биотехнологические раневые покрытия

С целью стимуляции репаративных процессов в хронических ранах, после очищения и купирования воспаления, предложено много средств и методов. Знания о роли коллагена в формировании соединительной ткани легли в основу **создания препаратов коллагена** в виде пленок, губок, порошков, паст с различными лекарственными включениями. Широкое применение получили **альгикол, комбутек, коллахит, метуракол, колоцил** и др. Материал **Коллост**, который изготовлен на основе растворимого высокоочищенного коллагена кожи крупного рогатого скота в последние годы с успехом широко используется. Способ получения позволяет сохранить трехспиральную структуру волокна и дает высокую степень очистки от балластных веществ. Он является матрицей для направленной тканевой регенерации и максимально приближенный к коллагену человека: когда имплант связывается с раной, фибробласты, лимфатические и кровеносные и сосуды, нервные волокна из окружающей здоровой ткани, внедряясь в коллагеновую матрицу, распределяется строго по ней. Создается переходный матрикс, который стимулирует иммунную систему организма, улучшает перенос факторов роста, активизирует гранулоциты, макрофаги, фибробласты, усиливает миграцию фибробластов и пролиферацию эпителиальных клеток. В процессе заживления биоматериал направленно замещается собственной соединительной тканью, исключается беспорядочный рост грануляционной ткани как ответной реакции организма на скорейшее закрытие раны [8,15,42,43,44,45,64].

### 1.4.3. Виды кожных эквивалентов

Кожные эквиваленты человека являются биотехнологическими заменителями кожи, которые состоят из клеточного компонента, т.е. культивированных клеток кожи человека, и подложки (матрицы, скаффолда), которая является аналогом внеклеточного матрикса [197,201].

Большинство биоинженерных заменителей живой кожи создают путем выращивания клеток кожи в лабораторных условиях и комбинирования их с матрицей. Эквиваленты кожи применяют для восстановления структуры и, следовательно, барьерной функции кожного покрова (основная цель лечения ожоговых больных), а также для инициирования заживления ран (при хронических незаживающих язвах) [92].

В качестве носителей для эквивалентов кожи при создании биоинженерных заменителей используют биоматериалы – это бесклеточные природные или синтетические вещества, имитирующие внеклеточный матрикс [92].

**Матрицы природного происхождения.** Децеллюлированную дерму и другие стромальные структуры принято считать максимально аналогичными нативной ткани [145].

Однако они имеют свои ограничения: сложность стандартизации и манипулирования в ходе культуральных работ (невозможность микроскопирования), доступность материала, риск инфицирования пациента. Бесклеточные лиофилизированные матрицы кожи человека (**AlloDerm**) [138] и кожи свиней (**Permacol**) [132] являются наиболее известными примерами матриц природного происхождения, которые не только входят в состав эквивалентов кожи, но и выпускаются в виде отдельных продуктов. Данные препараты создают путем удаления эпидермиса и внутридермальных клеточных элементов, при этом сохраняют структуру нативной дермы. Они характеризуются естественной дермальной пористостью, необходимой для быстрой регенерации и васкуляризации трансплантата, что является несомненным преимуществом этих материалов. В исследованиях *in vitro* показано, что матрицы из децеллюлированной дермы способствуют адгезии, росту и функционированию нескольких типов клеток [188]. Кроме того, при создании таких матриц наблюдается частичное сохранение базальной мембраны, что помогает в прикреплении эпидермальных клеток [114,164]. Тем не менее, эти продукты дорого стоят и имеется риск передачи вирусных инфекций [92,141].

**Искусственные коллагеновые матрицы.** Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса дермального слоя. Медико-биологическими свойствами коллагена являются способность ускорять заживление ран, усиливать адгезию тромбоцитов и вызывать гемостаз, являться естественным субстратом для миграции клеток кожи пациента при отсутствии антигенности, что и обусловило его широкое применение в реконструктивной хирургии [106,159].

Существует три основных формы коллагена, использующие при создании эквивалентов кожи: гидрогель, губка и решетка [92].

**Хитозановые матрицы.** Хитозан является еще одним природным полимером, наряду с коллагеном, широко применяемый в заживлении ран. Он обладает многочисленными достоинствами, в том числе биосовместимостью с биологическими тканями, антибактериальными свойствами, биоразлагаемостью и кровоостанавливающей активностью [144,187]. Хитозан способен стимулировать синтез коллагена и связываться с фактором роста фибробластов, что может ускорять заживление ран [107].

**Синтетические полимерные матрицы.** Исследования с применением синтетических полимеров для создания эквивалентов кожи были направлены на возможности сочетания их с природными полимерами [174]. Примером такой комбинированной матрицы стал препарат **Integra**, состоящий из бычьего коллагена и хондроитина-6-сульфата с тонкой силиконовой подложкой, которая выступает в качестве временной замены эпидермису [143,150,158]. Как считается, препарат обеспечивает хорошие функциональные и эстетические результаты при

лечении ожогов [166]. Однако инфекция после использования **Integra** по-прежнему остается наиболее частым осложнением [92,148,157].

**Виды кожных эквивалентов.** Эквиваленты кожи могут представлять собой монокультуру и содержать только слой эпидермиса или только слой дермы либо иметь полнослойную структуру [160]. Существующие виды эквивалентов кожи можно разделить на три основные группы: дермальные, эпидермальные и полнослойные [28,92].

**Эпидермальный тип эквивалента.** Для создания такого типа эквивалента кожи применяют кератиноциты. В зависимости от источника получения клеток такие эквиваленты могут быть аутологичными (источником клеток является кожа самого пациента) или аллогенными (клетки получены из кожи донора). Достаточно лоскута кожи размерами 1–2 см<sup>2</sup> для культивирования кератиноцитов. С помощью механических воздействий и ферментов эпидермис отделяют от дермы, затем дополнительной ферментативной обработкой получают суспензию отдельных кератиноцитов. Первичные кератиноциты культивируют до нескольких недель в лаборатории, в результате получают пласты кератиноцитов, в несколько раз превышающие по площади размер донорского кожного лоскута [92,184].

В частности, к этой группе эквивалентов относятся такие коммерческие продукты, как **MySkin™** и **CryoSkin™** (Altrika, Великобритания), состоящие из слоя аутологичных кератиноцитов на гибкой силиконовой мембране. В 2011 году оба препарата были успешно апробированы у пациентов с ожоговыми поражениями в ведущих ожоговых центрах Великобритании [28,180].

Продукт **Epicel**, американской компании Genzyme Biosurgery, который состоит из многослойного пласта аутологичных кератиноцитов (2–8 слоев), применяется при глубоких ожоговых ранах [28,180]. Epicel был применен для 30 ожоговых пациентов со средней площадью ожога  $37 \pm 17$  % тела. Достигнуто постоянное покрытие в среднем 26 % площади тела по сравнению с классическими трансплантатами (в среднем 25 % площади). Последний результат составил в среднем  $69 \pm 23$  %, 90 % из этих сильнообожженных пациентов выжили [122].

Несмотря на достижения и перспективность метода использования культур кератиноцитов для лечения ран, существует ряд недостатков, ограничивающих его эффективное применение. Длительность культивирования пластов аутокератиноцитов велика и составляет 3–4 недели, тем самым резко увеличивается риск осложнений и невозможность создания банка; сложность приживления на раневую поверхность и отторжение аллогенных кератиноцитов; высокая стоимость затрат сложность условий культивации клеток эпидермиса. Кроме того, данные клеточные продукты успешно используются только при сохраненном дермальном слое или при сочетанном применении с дермальными эквивалентами [28,84,92].

Наиболее изученным считается дермальный тип эквивалента.

**Дермальный тип эквивалента.** Он представляет собой клетки соединительной ткани – фибробласты в совокупности с коллагеновой матрицей (подложкой). Клетки могут заселять поверхность и/или весь объем матрицы. По данным литературным, в настоящее время существует много доступных коммерческих дермальных эквивалентов и многие из таких продуктов хорошо протестированы и проанализированы на уровне доклинических и клинических испытаний [119,165,180,181]. Многие современные биосовместимые дермальные трансплантаты в некоторой степени способны имитировать основные свойства соединительной ткани кожи человека, обеспечивая структурную целостность, эластичность и наличие сосудистого русла. Фибробласты легко выделить и технологически просто вырастить, в то же время они являются активными клеточными компонентами, способные структурировать коллаген дермы, стимулировать развитие грануляций и секретировать ряд факторов роста, которые ускоряют регенерацию тканей. Неудивительно, что широкое распространение во всем мире получили именно дермальные эквиваленты с фибробластами.

К дермальным типам эквивалента относятся **TransCyte**, состоящие из аллогенных фибробластов неонатальной крайней плоти человека, связанных с кремниевой мембраной и выращенных на свином коллагене, покрывающем нейлоновую сетку [92,184]. Проведено РКИ использования TransCyte и сульфадиазина серебра с одинаковым расположением ран у 11 пациентов. Раны, которые подвергали действию TransCyte, заживали гораздо быстрее до состояния реэпителизации (11,14 против 18,4 сут). Наблюдение за ранами показало, что на 3, 6 и 12-й месяц они заживали с существенным меньшим гипертрофическим рубцеванием по сравнению с лечением сульфадиазином серебра [184].

На сегодняшний день ведущее место занимают компании, находящиеся на территории США. «Advanced BioHealing, Inc.» производящая препарат «**Dermagraft**», который представляет собой криоконсервированные аллогенные фибробласты человека (из кожи крайней плоти новорожденных), выращенные на биосорбирующем сетчатом скаффолде из полигликана (викрила). В процессе производства продукции-человеческие фибробласты пролиферируют, чтобы заполнить промежутки между этой помостой и секретируют коллаген, другие белки внеклеточного матрикса, факторы роста и цитокины, создавая трехмерную ткань человека, содержащее метаболически активные живые клетки. Исследования показывают доказательства положительной связи цитокинов в гипоксии в регуляции ангиогенеза. Dermagraft содержит только человеческие дермальные фибробласты и их секретлируемые продукты и лишен других типов клеток таких как макрофаги, лимфоциты, эндотелиальные клетки, или кератиноциты. Фибробласты используются от квалифицированного банка клеток и тщательно проверенные на инфекционные агенты. Достижение этих кожных заменителей

заключается в том, что культивируемые фибробласты в основном остаются жизнеспособными и метаболически активными после разморозки и нанесение на раны [186]. Препарат Dermagraft применяется при лечении синдрома диабетической стопы и венозных трофических язв [13,117,140,141,156]. Среди преимуществ, следует отметить то, что он полупрозрачный, позволяет проводить продолжительные наблюдения подлежащей раневой поверхности. Фибробласты прошли тест на безопасность. Нет никаких неблагоприятных реакций, например, отторжений. Равен аллотрансплантату или лучше его по приживаемости, времени заживления, раневым выделениям и инфекции. Он противопоказан при инфицированных язвах [92].

Продукт **Tiscover**, производство компанией A-SKIN B.V., Amsterdam, Netherlands, состоит из децеллюлязированной дермы человека с аутологичными фибробластами кожи. Толщиной 1–2 мм. Применяется при длительнонезаживающих ранах [28].

Продукт **Hyalomatrix/Hyalograft3d**, производство компанией Fidia Advanced Biopolymers, Padua, Italy, является двухслойным эквивалентом из гиалуроновой кислоты, силиконовой мембраны и аутологичных фибробластов. Толщиной 1–2 мм. Применяется при ожоговых и длительнонезаживающих ранах [25,28,116,161].

**Полнослойный тип эквивалента.** Полнослойный тип эквивалента кожи состоит из эпидермального и дермального слоев. Его также принято называть живым эквивалентом кожи. Перспективным аутологичным кожно-эпидермальным эквивалентом является композитный культивируемый заменитель кожи, разработанный в Цинциннати (США). Этот эквивалент кожи состоит из коллаген-глюкозаминогликановой подложки, которая содержит аутологичные фибробласты и кератиноциты. Данный продукт в состоянии обеспечить постоянную замену дермального и эпидермального слоев кожи, он известен в настоящее время как **PermaDerm** [143,160].

В 2009 году немецкие ученые сообщили о разработке композитного аутоотрансплантата с использованием **MatriDerm** в качестве матрицы для выращивания аутологичных фибробластов и кератиноцитов [120,124,161].

**Apligraf** является самым известным из полнослойных эквивалентом кожи. Это эквивалент кожи, состоящий из дермального компонента — матрицы из бычьего коллагена 1-го типа, заселенной неонатальными фибробластами человека, и эпидермального слоя, образованного из выращенных кератиноцитов на поверхности эквивалента. В нескольких многоцентровых рандомизированных клинических исследованиях (РКИ) была показана эффективность применения **Apligraf** для лечения ожогов, длительно незаживающих ран, венозных и диабетических трофических язв, для заживления донорских мест в результате данный препарат одним из первых тканеинженерных эквивалентов был одобрен FDA для лечения кожных ран [19, 108,121,154,194]. В обзоре Cochrane показано, что полнослойный

эквивалент кожи вместе с компрессионной повязкой ускоряет заживление венозных язв по сравнению с использованием только компрессионной повязки [92,152].

Кроме того, Apligraf используется для лечения других дерматологических заболеваний: язвенной гангренозной пиодермии, буллезной склеродермии, буллезном эпидермолизе, язвенном саркоидозе, липоидном некробиозе [127,179]. Наблюдали более быструю эпителизацию ран с минимальным образованием рубцов и рецидивов. После хирургического разделения слипшихся пальцев отмечали улучшение функционирования кистей рук [19,179].

Продукт **OrCel**, производство компанией Forticell Bioscience, Inc., USA, представляет из себя двухслойный матрикс из бычьего коллагена I типа на пористом матриксе; в пористом слое – аллогенные дермальные фибробласты из крайней плоти новорожденных, на непористом слое – эпидермальные кератиноциты. Толщиной 1 мм. Применяется при ожоговых ранах [28,180].

Продукт **Laserskin**, производство компанией Fidia Advanced Biopolymers Abano Terme, Italy, представляет из себя аутологичные кератиноциты и фибробласты, полученные из биопсии кожи, культивируются на микроперфорированном лазером биodeградируемом матриксе из этерифицированной бензилом гиалуроновой кислоты. Клетки перфорируют и мигрируют сквозь матрицу. Микроперфорации работают как дренаж для раневых выделений. Применяется при неглубоких ожоговых ранах, при венозных язвах и язвах СДС [92,183].

Недостатком практически всех «живых эквивалентов кожи» является высокая стоимость, ограниченная эффективность (не могут быть использованы у пациентов с аллергией на любой животный продукт, пенициллин) [92].

#### **1.4.4. Применение кожных эквивалентов при синдроме диабетической стопы**

Наиболее известными и изученными кожными эквивалентами в лечении СДС являются Dermagraft и Apligraf [128,134].

Препарат Dermagraft многие годы применяется при лечении синдрома диабетической стопы. Проведено многоцентровое РКИ использования у 314 пациентов с хроническими диабетическими язвами Dermagraft и традиционной терапии. На 12-й неделе у 30,0 % опытных пациентов раны полностью закрылись по сравнению с 18,3 % в контрольной группе. Хотя появление неблагоприятных эффектов было похожим у обеих групп, у опытной 19,0 % испытывали связанные с язвами побочные заболевания (инфекция, остеомиелит, целлюлит) по сравнению с 32,5 % в контрольной [92,137].

РКИ на 15 пациентах с хроническими диабетическими язвами (дольше 6 недель) сравнивало вмешательство с использованием Dermagraft с разгрузкой стопы с помощью индивидуальной разгрузочной повязкой (ИРП) и контрольной группой (только ИРП). К 12-й



неделе 71,4 % язв было вылечено в опытной группе и 14,3 % – в контрольной. Раны закрылись существенно быстрее в опытной группе [153].

Многоцентровое клиническое исследование Dermagraft при лечении язв у 62 пациентов после хирургической санации. Пациентов перевязывали салиновой марлей или повязками из вспененного полиуретана еженедельно. К 12-й неделе у 44 % пациентов наблюдалось полное закрытие ран, 52 % вылечились к 20-й неделе. Медиана составила 13 недель. Dermagraft показал себя безопасным и эффективным в лечении незаживающих диабетических язв [92,198].

Многоцентровое рандомизированное слепое исследование проводили для оценки ранозаживления у 50 пациентов с диабетическими язвами. Пациентов разбили случайным образом на четыре группы (три отдельные дозировки Dermagraft и одна контрольная группа). Была получена дозозависимая кривая: язвы, лечившиеся наиболее высокой дозой Dermagraft, заживали существенно лучше по сравнению с традиционными методами. 50 % язв с Dermagraft и 8 % контрольных полностью зажили [92,162].

Самым известным из полнослойных эквивалентом кожи является **Apligraf**. Эффективность применения **Apligraf** для лечения длительно незаживающих язв при СДС доказана во многих РКИ.

В многоцентровом РКИ с 72 пациентами сравнили результаты использования Apligraf вместе со стандартной терапией и только стандартной терапии в лечении диабетических язв. Наблюдалось существенное уменьшение времени до полного закрытия в опытной группе (у 51,5 %) по сравнению с контрольной (26,3 %) к 12-й неделе [92,129].

Лечение Apligraf в совокупности с тщательным уходом за раной дало 12 % снижение стоимости лечения в течение первого года по сравнению со стоимостью тщательного ухода [92].

#### **1.4.5. Клиническое применение дермальной эквивалента российского производства**

В России, среди эквивалентов кожи, наиболее длительный клинический опыт имеется при применении отечественного биомедицинского клеточного продукта «Дермальный Эквивалент» (ДЭ) (производства НИИ цитологии РАН) – аллогенных фибробластов, заключенных в коллагеновый гель. ДЭ успешно апробирован при лечении трофических язв и ожоговых ран в клиниках Санкт-Петербурга [3,36,47,65,74,75].

В исследованиях Марковой А.Н и соавт. (2016) показано, что биологические активные повязки с живыми аллофибробластами оказывают выраженный стимулирующий эффект на заживление ожоговых ран 3аб–4 степени, достоверно сокращаются сроки заживления ран по сравнению с традиционными методами лечения, а также затраты на пострадавших [51].

Королева Т.А с соавт. на основании проведенного исследования считает, что использование эквивалентов кожи (клеточной суспензии и покрытия Suprathel®) у детей с глубокими ожогами наряду с ранним хирургическим лечением позволяет добиться хороших эстетических результатов после оперативных вмешательств, что особенно важно при локализации зон повреждения в косметически значимых областях [46].

В.М. Седов и его коллеги показали эффективность клеточной терапии в лечении больных с венозными язвами нижних конечностей. Они использовали культуру фибробластов штамма 1100/14, которые выращивали на раневом покрытии «Фолидерм», в комплексном лечении трофических язв, обусловленных варикозной болезнью и посттромбофлебитическим синдромом. Сроки заживления составили 1,5 недели для варикозных и 3,2 недели для посттромбофлебитических язв, в то время как в контрольной группе, несмотря на использование всего арсенала хирургических и консервативных методов коррекции венозной недостаточности, заживление язв наблюдалось только у 82 % пациентов в сроки от 3,6 до 3,9 месяцев [99].

Таким образом, сегодня собрана большая научная база доказательств, свидетельствующая об эффективности применения отечественного ДЭ при ожогах и венозных трофических язвах. Однако, данные о возможности, условиях, эффективности применения и длительности терапевтического эффекта ДЭ при СДС очень малочисленны, комплексного изучения этого вопроса не проводилось, что делает целесообразным специальное исследование в этом направлении.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика обследованных лиц

В исследование были включены 100 пациентов, из числа больных с СДС, проходивших лечение в 2013-2016 годах в отделении гнойной хирургии Госпиталя для ветеранов г. Санкт-Петербурга.

У всех пациентов имелся СД 2-го типа, 59 из них находились на инсулинотерапии, 41 получали пероральные сахароснижающие препараты. Длительность заболевания СД у обследованных пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение обследованных пациентов по длительности заболевания СД

Длительность СД	1–5 лет	6–10 лет	11–15 лет	16–20 лет	21–25 лет	26–30 лет	Более 30 лет
Кол-во пациентов	21	30	23	11	5	5	5

В связи с задачами исследования 50 % пациентов, включенных в исследование, имели нейроишемическую форму СДС, 50 % – нейропатическую форму СДС.

Среди пациентов было 48 мужчин и 52 женщины. Возраст обследуемых больных: от 43 до 92 лет (средний возраст  $68 \pm 24$  лет).

Таблица 2 – Распределение обследованных больных по возрасту, полу и форме СДС

	Пол	40–49 лет	50–59 лет	60–69 лет	70–79 лет	80–89 лет	90–99 лет
Нейропатическая форма СДС	М	6	13	9	3	0	
	Ж	1	5	4	4	5	
Нейроишемическая форма СДС	М	1	6	5	3	3	
	Ж	0	2	7	13	9	1

Все пациенты имели тяжелый полиморбидный фон. Практически у всех пациентов имелась хроническая ишемическая болезнь сердца, а 20 пациентов перенесли острый инфаркт миокарда. У большинства пациентов также диагностирована цереброваскулярная болезнь, а у 20 больных имелись последствия острого нарушения мозгового кровообращения различных сроков давности. Кроме того, у больных имелись такие осложнения сахарного диабета как диабетическая ретинопатия и нефропатия (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика сопутствующих заболеваний у обследованных больных

Сопутствующая патология	Количество больных
Ишемическая болезнь сердца	99
Артериальная гипертензия	99
Острый инфаркт миокарда в анамнезе	20
Цереброваскулярная болезнь	88
Острое нарушение мозгового кровообращение в анамнезе	20
Диабетическая ретинопатия	12
Хроническая почечная недостаточность	26
Желчекаменная болезнь	7
Хроническая обструктивная болезнь легких	14
Эрозивное и эрозивно-язвенное поражение желудочно-кишечного тракта	9
Хроническая венозная недостаточность	15
Хронический панкреатит	5
Ожирение	15
Дегенеротивно-дистрофические заболевания позвоночника	49
Хроническая анемия	11

У всех пациентов, как проявление СДС, имелся язвенный дефект кожи и мягких тканей на стопе (трофическая язва), существующий более 6 недель, который, после стандартного лечения, к моменту исследования находился в стадии грануляции.

Таблица 4 – Длительность существования диабетической трофической язвы у обследованных больных.

Длительность язвы	6 недель	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5–6 мес.	7–12 мес.	13–24 мес.	Более 25 мес.
Количество пациентов	23	21	18	7	8	14	7	2

У большинства пациентов язвенный дефект располагался на подошвенной поверхности стопы и пальцев (таблица 5).

Таблица 5 – Локализация язвенного дефекта у обследованных больных

Локализация язвы	Пяточная область	Культя стопы	Латеральный и медиальный край стопы	Пальцы стопы	Тыл стопы	Подошвенная поверхность
Количество пациентов	14	22	15	30	2	17

Глубина распространения язвенного дефекта (в соответствии с классификацией Техасского университета) у обследованных пациентов представлена в таблице 6. Как видно из этой таблицы, язвенный дефект у обследованных пациентов к моменту включения их в обследование, не распространялся на кости, мышцы, сухожилия, что соответствовало 1 А и 1 С классам по Техасской классификации [117].

Таблица 6 – Глубина распространения язвенного дефекта у обследованных больных по классификации Техасского университета

0 А		1 А	61 пациент	2 А		3 А	
0 В		1 В		2 В		3 В	
0 С		1 С	39 пациентов	2 С		3 С	
0 D		1 D		2 D		3 D	

По площади язвенного дефекта больные распределились следующим образом (таблица 7). Как видно из этой таблицы, у большинства больных язвенные дефекты были площадью до 7 см<sup>2</sup>.

Таблица 7 – Площадь язвенного дефекта у обследованных больных

Площадь язвенного дефекта (см <sup>2</sup> )	1–3	4–7	8–11	12–16	17–21	22–25
Количество больных	21	36	12	11	13	7

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты обоего пола старше 18 лет, с компенсированным СД, у которых по данным клинического и инструментального обследования имеется СДС с язвенным дефектом стоп в стадии грануляции, площадью от 1 до 25 см<sup>2</sup>, который существует более 6 недель, не распространяется на кости, мышцы, сухожилия (класс 1А, 1С по Техасской классификации [117]), и при условии, что площадь язвенного дефекта не уменьшалась в размерах после 2-х недель стандартного местного лечения, добровольное информированное письменное согласие пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения пациентов из исследования: пациенты моложе 18 лет, отсутствие признаков синдрома диабетической стопы, или наличие глубокого язвенного дефекта с поражением сухожилия и кости, язва в стадии экссудации или эпителизации, пациенты с заболеваниями крови и заболеваниями соединительной ткани, с онкологическими заболеваниями и получающими химиотерапию/лучевую терапию, пациенты злоупотребляющие алкоголем, пациенты с кахексией и гипоальбуминемией, пациенты у которых креатинин в

2 раза превышает верхнюю границу нормы, АЛТ, АСТ в 3 раза превышают верхнюю границу нормы, при отсутствии письменного согласия пациента на участие в исследовании.

Критерии выбытия из исследования: 1. Желание пациента. 2. Нарушение пациентом времени прохождения контрольных точек обследования.

Все пациенты, включенные в исследование, в зависимости от использованного метода местного лечения трофической язвы были, путем рандомизации, разделены на основную (60 пациентов) и группу сравнения (40 пациентов). Была применена простая одномоментная рандомизация с использованием цветовой маркировки в закрытых конвертах. Рандомизационный код: определяется по цвету карточки внутри закрытого конверта:

- красная карточка – стандартное лечение – группа сравнения.

- желтая карточка – стандартное лечение, плюс лечение с применением ДЭ – основная группа.

Каждая группа состояла из равных по количеству пациентов подгрупп в зависимости от формы СДС (таблица 8).

Таблица 8 – Распределение обследуемых пациентов по группам / подгруппам, характеру местного лечения трофических язв

Группы, количество пациентов	Подгруппы, количество пациентов	Характер лечения
Основная группа (n=60)	А – нейропатическая форма СДС (n=30)	Стандартное комплексное лечение + аппликация на рану ДЭ
	Б – нейроишемическая форма СДС (n=30)	
Группа сравнения (n=40)	А1 – нейропатическая форма СДС (n=20)	Стандартное комплексное лечение + местное стандартное лечение
	Б1 – нейроишемическая форма СДС (n=20)	

Обозначение: n – количество пациентов.

Обследованные группы пациентов были сопоставимы по возрасту, полу, характеру язвенного дефекта и сопутствующей патологии (таблица 9).

Больные в сравниваемых подгруппах были сопоставимы по исходной площади язвенного дефекта, и разница была недостоверной ( $p > 0,05$ ) (таблица 10). Вместе с тем, площадь язвы была существенно ( $p < 0,05$ ) больше в подгруппах с нейропатической формой по сравнению с подгруппой пациентов с нейроишемической формой СДС.

Таблица 9 – Распределение больных по возрасту и глубине язвенного дефекта

Группы/Подгруппы пациентов	Глубина язв по Техасу	40–49 лет	50–59 лет	60–69 лет	70–79 лет	80–89 лет	90–99 лет
Основная группа/подгруппа А	1 А	4	11	6	2	2	
	1 С		1	2	1	1	
Основная группа/подгруппа Б	1 А	1	4	4	3		
	1 С		1	3	7	6	1
Группа сравнения/подгруппа А1	1 А	3	6	4	3	1	
	1 С			1	1	1	
Группа сравнения/подгруппа Б1	1 А		2	2	2	1	
	1 С		1	3	4	5	

Таблица 10 – Средние показатели ( $M \pm m$ ) площади ( $cm^2$ ) трофических язв в обследованных группах/подгруппах больных перед началом дифференцированного лечения

Группы/Подгруппы пациентов	Площадь язв ( $cm^2$ )
Основная группа/подгруппа А	4,9–23,2 (11,3±6,2)
Основная группа/подгруппа Б	1,3–9,3 (5,6±3,1)
Группа сравнения/подгруппа А1	3,5–22,2 (10,6±6,7)
Группа сравнения/подгруппа Б1	1,1–12,4 (6,1±4,2)

Общее лечение не различалось в обследованных группах, но зависело от формы СДС. Оно включало в себя комплекс лечебных мер:

1. Коррекцию углеводного обмена с участием врача эндокринолога. Больным производилось суточное мониторирование глюкозы крови. При декомпенсированном сахарном диабете больные переводились на инсулинотерапию. Больным назначался инсулин короткого действия перед завтраком, обедом и ужином и пролонгированного действия перед завтраком и перед сном. Мониторинг глюкозы крови продолжался. Больные осматривались эндокринологом в динамике, с коррекцией лечения.

2. Назначали системную антибактериальную терапию. Начальная антибактериальная терапия в подавляющем проценте случаев проводилась эмпирически на основании клинических и эпидемиологических данных о преобладающих возбудителях, степени тяжести инфекционного процесса, наличие и степени выраженности нефропатии, автономной нейропатии (оказывает влияние на моторику ЖКТ и всасывания лекарственного препарата), аллергических реакций, предшествующей антибиотикотерапии и ее эффективности [4]. При получении посевов из раны терапия корректируется на основании полученных результатов.

3. Проводилась инфузионная нейро- и ангиотропная терапия. При лечении нейропатической формы СДС применялись витамины группы В и препараты а-липолевой кислоты. Альфа-липолевая кислота является коферментом ключевых ферментов цикла Кребса, что позволяет восстановить энергетический баланс нервных структур, и антиоксидантом (естественный окислитель), что дает возможность предотвратить дальнейшее повреждение нервных структур и защитить нервную ткань от воздействия свободных радикалов [27]. Назначались инфузии в дозе 600 мг в сутки внутривенно капельно на 150,0 мл 0,9 % раствора NaCl в течении 2-х недель, с последующей ступенчатой терапией таблетированных форм. Для улучшения артериального кровотока применялись простаноиды. Алпростадин (Вазапостан), препарат простагландина E1, обладает сосудорасширяющим и ангиопротективным эффектами, улучшает реологию крови за счет повышения деформируемости эритроцитов, снижает адгезию и агрегацию тромбоцитов, обладает фибринолитическими свойствами [27,90]. Вазапостан вводили внутривенно капельно в дозе 40–60 мкг/сутки в 250 мл физиологического раствора, в течение 2-х часов. Минимальный курс 14 дней. Всем пациентам назначалась антиагрегантная терапия (тромбо АСС 100мг в сутки).

4. Среди дополнительных методов лечения применяли гипербарическую оксигенацию, фотомодификацию крови (внутривенное лазерное облучение крови), озонотерапию.

5. При нейроишемической форме СДС, по показаниям, проводилась эндоваскулярная реваскуляризация конечности (чрезкожная баллонная ангиопластика, стентирование), оно выполнено у 23 пациентов основной группы и у 16 пациентов группы сравнения.

6. При нейропатической форме СДС проводилась разгрузка стопы [6,8]. Для этого использовали: постельный режим, больные перемещались по отделению на костылях и инвалидном кресле-коляске. У некоторых пациентов использовали индивидуальную разгрузочную повязку (ИРП) на голень и стопу. Техника наложения ИРП состояла в следующем. На первом этапе на стопу и голень одевался двойной слой подшинного чулка – стокинет, выпуклые части стопы и голени закрывались амортизирующей лентой микрофоум. Начиная с подошвы к голени в один слой циркулярно накладывался полужесткий бинт – софт-каст. С помощью жесткого бинта – скотч-каста – формировался каркас. Далее от подошвы к голени циркулярно накладывался еще один слой полужесткого бинта. Изделие смачивалось водой, и через 20–25 минут ИРП S-образно разрезалось специальной осцилляторной пилой или вскрывалось с помощью ножниц для обычного гипса. Разрезанная повязка фиксировалась эластичным бинтом [4]. На амбулаторное лечение больные выписывались с рекомендациями носить разгрузочный полуботинок или модулярный ортопедический аппарат Эйркаст.

7. Всем пациентам, которые при поступлении в стационар имели гнойно- некротические изменения в язве выполнялся механический и физический дебридмент: этапные некрэктомии, с



использованием ультразвуковой кавитация («Sonoca 400», Söring, Германия) и вакуумтерапии (VivanoТес, Hartmann, Германия) с последующими ежедневными перевязками с антисептиками и местными антибактериальными средствами. Проводимый дебридмент не различался в основной группе и группе сравнения.

После очищения трофической язвы и перехода раневого процесса в стадию грануляции первоначально у всех обследованных больных в течение 14 дней использовали стандартное местное лечение: производилась обработка дна раны 0,05 % раствором хлоргексидина биглюконата, с последующим наложением на рану марлевой повязки с 10 % раствором Бетадина (Эгис, Венгрия). Перевязки выполнялись через день.

В дальнейшем, после рандомизации и начала исследования, больным группы сравнения было продолжено стандартное местное лечение трофической язвы, а больным основной группы в качестве местного лечения выполняли однократно аппликацию на трофическую язву дермального эквивалента (ДЭ) и последующего местного лечения по схеме, описанной ниже.

## **2.2. Методика приготовления дермального эквивалента**

Дермальный эквивалент – комплексный биомедицинский клеточный продукт, который включает культивированные *in vitro* дермальные фибробласты (ФБ) человека, заключенные в гель, приготовленный на основе коллагена первого типа. Культивирование ФБ и приготовление ДЭ осуществлялось в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН, в соответствии с модифицированной методикой Bell E. (1979).

ДЭ зарегистрирован в Российской Федерации (Регистрационное удостоверение №ФС 022620063178-06 Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития), внесен в государственный реестр изделий медицинского назначения и медицинской техники (нормативный документ ТУ 9444 – 002 – 02698542 – 2006) и имеет разрешение к клиническому применению с 04 октября 2006 года.

Для культивирования нормальных фибробластов кожи человека использовали питательную среду DMEM (фирма Биолот, Россия) с добавлением смеси антибиотиков пенициллина/стрептомицина (Sigma, США) и сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (HyClone, Австрия). Фенолфталеин являлся обязательной добавкой для идентификации pH среды. Оптимальное значение pH среды составляет 7,2–7,4. ФБ культивировали в чашках Петри и/или в культуральных флаконах различных производителей (Nunc, TPP, Scientific Orange и др). Для пассирования (пересева) клеток использовали 0,25 % раствор трипсина и версена (Gibco, США).

Для приготовления ДЭ использовали ФБ, выделенные из лоскутов кожи. Донорский материал был получен из клиник, которые выполняли пластические операции. Забор осуществлялся только от здоровых пациентов, а учреждение, которое предоставляло материал, проводило все необходимые анализы. Работы с культурами клеток выполнялись в специально предназначенных микробиологически безопасных боксах, где для избежания контаминации культур бактериями или грибами был организован поток стерильного воздуха.

Приготовление ДЭ включает в себя несколько этапов:

## I. ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФБ ЧЕЛОВЕКА

1. Полученный лоскут кожи промывали в растворе PBS, содержащем смесь антибиотиков пенициллина/стрептомицина, и с помощью скальпеля измельчали на фрагменты площадью 1–2 мм<sup>2</sup>.

2. Нарезанные фрагменты кожи располагали в шахматном порядке на дне чашки Петри и сверху накрывали покровным стеклом.

3. Добавляли культуральную среду ДМЕМ (Биолот, Россия), содержащую 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, Австрия) и смесь антибиотиков пенициллин/стрептомицина (Sigma, США) и помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор.

4. После 3–5 дней культивирования из эксплантата появляются первые мигрирующие фибробласты. Скорость миграции клеток из различных образцов кожи может варьировать. Фрагменты кожи с выползающими фибробластами культивировали до достижения клетками монослоя.

## II. ПЕРЕСЕВ КЛЕТОК (ПАССИРОВАНИЕ)

1. Предварительно до 37°C нагревали культуральную среду и раствор ферментов (трипсин-версен).

2. Стерильной пипеткой удаляли израсходованную в процессе жизнедеятельности клеток среду из культуральных сосудов.

3. Флакон промывали небольшим количеством раствора ферментов несколько раз для удаления остатков среды, содержащей сыворотку и нейтрализующей действие фермента.

4. Добавляли раствора фермента, действующий на клеточные рецепторы, и гидролизуют их, что приводит к откреплению клеток от поверхности культурального сосуда.

5. Культуральные флаконы помещали в термостат на 2–5 минут при 37°C, (условия оптимального действия фермента).

6. Результат действия фермента контролировали через 2 минуты при помощи инвертированного светоптического микроскопа (Nicon, Япония).

7. В процессе инкубации распластанные клетки округлялись и начинали открепляться от дна культурального флакона.

8. Активным пипетированием клетки сбивали со дна культурального флакона и переносили на новые культуральные флаконы в соотношении 1:2. После чего в каждый из флаконов добавляли необходимый объём питательной среды.

### III. ПОЛУЧЕНИЕ КОЛЛАГЕНА I ТИПА.

Для получения коллагена использовали сухожилия мышинных хвостов.

1. Сухожилия вытягивали и механически измельчали для упрощения последующего процесса экстракции коллагена.

2. Измельчённые сухожилия экстрагировали уксусной кислотой при непрерывном перемешивании в течение 12–15 часов.

3. Затем производили центрифугирование и осаждение коллагена  $\text{NaCl}$ .

4. Для удаления остатков уксусной кислоты и фосфатов проводили последовательный диализ против уксусной кислоты и фосфатов.

5. После выполнения этих процедур коллаген получали в концентрированном виде. Чистоту и концентрацию полученного коллагена определяли методом электрофореза.

### IV. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДЭ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА.

Для приготовления ДЭ использовали клетки 5–8 пассажей. Все манипуляции производили на льду, так как при комнатной температуре происходит быстрая полимеризация коллагена.

1. Получали суспензию ФБ.

2. После разведения коллагена до заданной концентрации и подведения уровня pH до нейтрального в него добавляли суспензию ФБ.

3. С помощью аккуратного пипетирования ФБ равномерно распределяли в растворе коллагена, после чего полученную смесь переносили в стерильные чашки Петри.

4. Чашки Петри помещали в условия  $\text{CO}_2$ -инкубатора на 15–30 мин до момента полимеризации геля.

5. Затем на поверхность геля наносили питательную среду.

6. Культивирование ДЭ до момента использования осуществляли в течение 1–3 суток.

На рисунке 1 представлена фотография ДЭ, включающего ФБ человека, заключенные в коллагеновый гель.

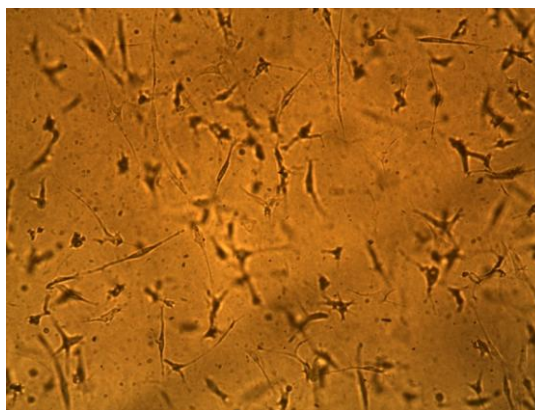


Рисунок 1 – Дермальные фибробласты в коллагеновом геле  
(микрофотография ув. об.  $\times 10$ )

### **2.3. Методика применения дермального эквивалента у больных с синдромом диабетической стопы**

Трансплантация на рану ДЭ пациентам основной группы выполнялась в условиях чистой перевязочной, в асептических условиях. ДЭ получали в день пересадки из НИИ цитологии РАН бесплатно, в рамках договора о совместном научном исследовании. Его транспортировка производилась в герметичных чашках Петри, в сосуде Дьюара, в максимально щадящем для клеточных культур режиме, исключая механическое и термическое воздействие, с поддержанием температуры  $+15^{\circ}\text{C}$ , среднее время доставки составило  $120\pm 35$  мин. ДЭ пинцетом извлекали из чашки Петри, укладывали на обработанную физиологическим раствором хлорида натрия раневую поверхность, полностью покрывая ее площадь (рисунки 2–4). Сверху накладывали повязку Воскопран (Биотекфарм, Россия), для предотвращения впитывания препарата. Поверх повязки Воскопран накладывали марлевую повязку и фиксировали марлевым бинтом. Перевязки проводились через день. Производились смены повязки Воскопран, сверху накладывалась стерильная салфетка и производилась фиксация бинтом. Между перевязками производилось орошение марлевой повязки физиологическим раствором хлорида натрия 2 раза в день, для предотвращения высыхания повязки в соответствии с инструкцией по применению ДЭ [36]. Больные выписывались на амбулаторное лечение с чистой, гранулирующей язвой и с краевой эпителизацией. В амбулаторных условиях производился мониторинг за больными.



Рисунок 2 – Дermalный эквивалент, транспортируемый в чашке Петри



Рисунок 3 – Извлечение дермального эквивалента из чашки Петри с помощью пинцета



Рисунок 4 – Аппликация дермального эквивалента на диабетическую трофическую язву

## 2.4. Методы обследования

У всех пациентов, включенных в исследование, до этого проведено стандартное клиническое обследование (сбор жалоб и анамнеза; осмотр нижних конечностей; лабораторные и инструментальные исследования), по результатам которого на основании критериев включения/исключения и отобраны кандидаты на исследование.

### **Сбор жалоб и анамнеза.**

При сборе жалоб и анамнеза выясняли длительность заболевания и тип СД, характер и эффективность проводимой терапии, наличие сопутствующей патологии и вредных привычек, особое внимание уделяли выяснению обстоятельств дебюта возникновения трофической язвы, сроков ее существования, характеру и условий в которых проводилось лечение, эффективности терапии, длительности ремиссии частоты рецидива.

### **Осмотр нижних конечностей.**

Внешний осмотр проводился в положении пациента лежа на спине. В первую очередь оценивалось состояние кожных покровов: цвет, пигментация, наличие и выраженность волосяного покрова, варикозно расширенных вен, отека, локализация трофической язвы, характер раневой поверхности и экссудации, выраженность краевой эпителизации. Также выполнялось сравнительное пальпаторное исследование пульсации, и аускультация характера кровотока в стандартных точках в проекции основных магистральных артерий (бедренной, подколенной, передней и задней тиббиальных) на обеих нижних конечностях.

**Лабораторное исследование** включало оценку уровня гликемии и эффективности лечения СД – исследование гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>); оценку функции внутренних органов по стандартному набору биохимических показателей (креатинин, мочевины, АЛТ, АСТ, билирубин, общий белок, холестерин), оценку состояния показателей периферической крови (выраженность анемии/эритроцитемии, системной воспалительной реакции, увеличения/уменьшения числа тромбоцитов в клиническом анализе крови), состояние тромбоцитарно-коагуляционного гемостаза по данным коагулограммы. общеклинический анализ мочи, с определением показателей ацетона и кетоновых тел и белка в моче. Все указанные исследования выполнялись в автоматизированном режиме в лаборатории Госпиталя для ветеранов войн.

**Инструментальное исследование**, наряду со стандартным общеклиническим (измерение артериального давления, электрокардиограмма, рентгенограмма органов грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и почек), включало в себя специальные методы.

**Оценка периферической чувствительности.** Применялось исследование различных видов чувствительности (тактильной, болевой, температурной и вибрационной), а также оценка коленных и ахилловых рефлексов [4].

Для оценки тактильной чувствительности применялась стандартная методика с использованием монофиламента массой 10 г (5.07 Semmes-Weinstein). Прибор состоит из специальной нити (монофиламента), закрепленной на ручке. Исследование проводилось в положении пациента лежа на спине, в спокойном, расслабленном состоянии. На подошвенной поверхности стоп в определенных точках (подошвенная поверхность 1 пальца, проекции I и V плюснефаланговых сочленений) исследователь прикасался монофиламентом. Монофиламент располагался строго перпендикулярно поверхности кожи, при прикосновении он прогибался. Тактильная чувствительность не нарушена, если пациент ощущал 2 из 3 прикосновений. Если пациент не ощущал 2 прикосновения, то тактильная чувствительность нарушена.

Болевая чувствительность исследовалась при помощи тупой иглы. Исследование проводилось на тыльной поверхности I пальца обеих стоп. Болевая чувствительность считалась не нарушенной, если пациент чувствовал боль от укола.

Температурную чувствительность оценивали с помощью специального прибора – термического наконечника тип-терм (thip-term). Исследование проводилось на тыльной поверхности I пальца обеих стоп. Температурная чувствительность считалась не нарушенной, если пациент ощущал разницу температур в исследуемых точках.

Вибрационную чувствительность оценивали при помощи градуированного камертона, вибрирующего с частотой 128 Гц. Исследование проводилось на тыльной поверхности I пальца в области межфалангового сочленения. При исследовании камертоном спрашивали у пациента, чувствует ли он вибрацию. Значение на шкале камертона в момент, когда пациент переставал ощущать вибрацию, считалась порогом вибрационной чувствительности. Вибрационная чувствительность считалась ненарушенной, если значение шкалы камертона в момент, когда пациент переставал ощущать вибрацию, соответствовала 8 условным единицам.

## **2.5. Оценка состояния кровоснабжения нижних конечностей**

### **2.5.1. Оценка магистрального кровотока в нижних конечностях**

**а) Ультразвуковое дуплексное сканирование артерий и вен нижних конечностей выполнено у всех обследованных больных.**

Анализ кривой доплерограммы позволял оценить характер магистрального артериального кровотока: неизмененный, сниженный, коллатеральный. Первый антеградный

высокий остроконечный пик характеризует систолу, второй ретроградный небольшой пик возникает в диастолу, третий антеградный небольшой пик регистрируется в конце диастолы. При наличии стеноза выше или вместе локализации определялся магистрально измененный кровоток, который характеризовался двухфазной амплитудой доплеровского сигнала. Ниже уровня окклюзии регистрировался коллатеральный тип доплерограмм, который характеризовался значительным изменением систолического пика и отсутствием как ретроградного, так и второго антеградного пиков. Этот тип кривой принято называть монофазной. По данным продольного и поперечного сканирования просвета артерий определяли локализацию, степень и протяженность стеноза, наличие окклюзии. Кроме того, всем больным рассчитывали лодыжечно-плечевого индекса ( $\text{ЛПИ} = \text{АД в исследуемой артерии} / \text{АД в плечевой артерии}$ ).

В норме артериальное давление на уровне лодыжек несколько выше или равно системному артериальному давлению, измеряемому на плече, а градиент давления между соседними сегментами конечности не превышает 30 мм рт. ст. Падение артериального давления в исследуемом сегменте по отношению к системному и к давлению в соседнем сегменте рассматривается как признак стеноза или окклюзии сосудов; при этом величина градиента давления прямо пропорциональна степени поражения сосудов.

Методика вычисления ЛПИ заключалась в следующем: с помощью сфигмоманометра и доплеровского датчика измеряется давление на плече, а затем на голени; ЛПИ вычисляется как отношение давления на голени к системному артериальному давлению.

В норме ЛПИ  $> 0,9$ , но  $< 1,5$ . Учитывая достаточно частое сочетание атеросклероза магистральных артерий и склероза Менкеберга (кальцификации среднего слоя артериальной стенки), ЛПИ может быть ложноположительным и не отражать степени нарушения кровотока. В таких случаях проводился анализ полученной ультразвуковой волны и вычислялся плечепальцевой индекс ( $\text{ППИ} = \text{АД в исследуемой артерии} / \text{АД в пальцевой артерии}$ ). Для определения АД в пальцевой артерии использовалась специальная манжетка для пальцев ног разного размера.

Также оценивали характер венозного кровотока в глубоких и поверхностных венах нижних конечностей (проходимость вен, наличие тромбов и ретроградного кровотока – рефлюкса). Ультразвуковое дуплексное сканирование артерий и вен нижних конечностей проводилось на аппаратах Xario (Toshiba, Япония) в отделении функциональной диагностики Госпиталя для ветеранов войн с использованием линейных/конвексных датчиков 5–12 МГц [4].

**б) Ангиография артерий нижних конечностей.** Это исследование выполнено у 44 пациентов, у которых по данным ультразвукового исследования выявлены нарушения в



кровотоке по магистральным артериям нижних, т.е выявлена *нейроишемическая форма СДС с целью оценки возможности реваскуляризации.*

Ангиография является самым информативным методом для топической диагностики облитерирующих заболеваний артерий и для планирования реваскуляризирующих операций. Использовались 2 метода: мультиспиральная компьютерная томоангиография (МСКТА) и традиционная рентгенконтрастная ангиография. Согласно современным рекомендациям, целесообразно проведение неинвазивных методов визуализации (компьютерная или магнитно-резонансная томография). Это метод позволяет получить изображение хорошего качества при менее выраженном облучении и без осложнений, связанных с артериальной пункцией [7]. При МСКТА вводили контраст через периферический катетер в локтевой вене. Оценивали результаты проходимости артерий нижних конечностей с помощью методики объемной реконструкции изображения.

Выполнение рентгеноконтрастной ангиографии осуществляли в операционной на аппарате Аxiom (Siemens, Германия) в Госпитале для ветеранов войн рентгенхирургической бригадой с использованием йодсодержащих водорастворимых контрастов.

При выполнении диагностической ангиографии применялись следующие доступы:

- через бедренную артерию (антеградный или ретроградный);
- через лучевую артерию (трансрадиальный).

*Выполнение ангиографии через бедренную артерию:* после обезболивания кожи пункция выполнялась в типичном месте, на 1 см ниже паупертовой связки. После получения пульсирующего кровотока из иглы в общую бедренную артерию заводился диагностический проводник, который продвигался в брюшной отдел аорты. По проводнику диагностический катетер (4-6F) заводился в надбифуркационный отдел абдоминального отдела аорты. При необходимости выполнения ангиографического исследования артерий противоположной конечности селективно контралатерально катетеризировалась общая подвздошная артерия. При ангиографии одной конечности общая бедренная артерия пунктировалась в антеградном направлении. Диагностический проводник вводился в общую бедренную артерию. Вводился контраст.

*Выполнение ангиографии через лучевую артерию (трансрадиальный доступ).* Отличительные особенности лучевого доступа для ангиографии артерий нижних конечностей: использование интродьюсеров небольшого диаметра (4-5F); обязательное введение спазмолитиков после установки интродьюсера для профилактики спазма артерий верхней конечности. Рекомендуется использовать проводники 0,018”–0,025”. При затруднениях при проведении проводника через артерии верхних конечностей выполняли ангиографию подведенным к месту затруднения катетером для выяснения причины. В случаях повышенной

извитости артерий верхних конечностей использовали проводник с гидрофильным покрытием. Следует учитывать, что выполнение ангиографии артерий нижних конечностей лучевым доступом связано с относительно большим расстоянием до нижних конечностей, поэтому нужно заранее рассчитывать длину катетера. В связи с этим лучевой доступ достаточно редко использовали для артерии графии нижних конечностей.

Ангиография бедренных и подколенной артерий выполнялась в прямой проекции; тibiоперонеального ствола и проксимальных отделов берцовых артерий – в косой проекции (под углом 30–35 градусов), при необходимости – в боковой проекции; берцовых артерий в средней трети и нижней трети голени – в прямой проекции; артерий стопы – в прямой и боковой проекциях [4].

Оценивали результаты исследования.

Морфология диабетической макроангиопатии, при которой периферическому атеросклерозу может сопутствовать кальциноз и фиброз артерий, придает ангиографической картине характерные черты. Этот метод исследования позволяет выявить многоэтажность окклюзий, сочетание их со стенозами в смежных сегментах магистралей и в коллатеральной сети, выраженную частоту дистальных поражений, в том числе артерий голени и стопы. С помощью ангиографии иногда удавалось обнаружить межсистемные пути кровообращения, а так же специфические деформации артерий виде «нитей ожерелья» или «струек дыма» [7].

Пользуясь ангиографией, определяли основные противопоказания к открытым реконструктивным операциям на сосудах. Практически всегда удавалось обнаружить поражение периферических артерий, служащих препятствием для прямой реваскуляризации из-за высокого сопротивления магистральному кровотоку. Выявление диффузного поражения глубокой артерии бедра, выраженного кальциноза, а также рассеянного типа ее строения, позволяли избежать напрасных попыток профундопластики.

По показаниям 39 пациентам выполнена баллонная ангиопластика и стентирование артерий нижних конечностей.

Если по данным инструментального обследования выявлялись гемодинамически значимые стенозы или окклюзии кровотока по магистральным артериям нижних конечностей то регистрировали нейроишемическую форму (НИ) СДС, если таковых не регистрировалось – нейропатическую форму (НП) СДС.

### **2.5.2. Оценка периферического кровоснабжения**

Исследование транскутанного напряжения кислорода ( $T_{sp}O_2$ ) на стопе выполнено у 100 пациентов для оценки кровоснабжения кожи и мягких в лаборатории периферического

кровообращения больницы № 14. Для этого использовали оксимонитор-газоанализатор TSM-3 (Radiometer, Дания).

Методика определения напряжения кислорода в капиллярной крови кожного покрова заключалась в следующем [11]. На тыле стопы в первом межпальцевом промежутке при положении больного сидя и лежа с помощью самофиксирующего кольца приклеивали датчик, каковым является кожный электрод Кларка, со встроенной микрочечью. Перед его установкой кожу протирали 70 % медицинским спиртом. Датчик устанавливали на участке кожи с ровной поверхностью, лишенной волос, гиперкератоза и рубцевания, что обеспечивает герметичное прилегание самофиксирующегося кольца к поверхности тела. Допустимо сбрить волосы и отмыть ороговевший слой 0,25 % раствором нашатырного спирта. После установки датчика, между кожей и полупроницаемой мембраной электрода, в камеру самофиксирующегося кольца помещали 3–4 капли контактной жидкости, запатентованной изготовителем как S-44416. В свою очередь, между полупроницаемой мембраной электрода и его регистрирующим устройством, находится другой запатентованный электрод S-44316. В течение 20–25 минут кожа под электродом прогревалась до температуры 43 градусов. При такой температуре происходило предельное для возможностей данного больного расширение кожных капилляров, вследствие чего микрокровоток достигал возможного максимума. Благодаря этому наступало динамическое равновесие парциального давления газов, в том числе и кислорода, содержащегося в крови капилляров кожи и в жидких средах электрода, что и регистрировал прибор. Парциальное давление кислорода под электродом отражало доставку его к коже и, тем самым, объективно характеризовало регионарный уровень микроциркуляции. Сигнал, улавливаемый прибором, преобразовался компьютерной приставкой в числовые значения, выражаемые в мм рт. ст. При отеке или склерозирующем уплотнении кожи, исследование приходилось повторять в 2–3 точках изучаемого сегмента конечности. Результатом считалась средняя арифметическая всех измерений одного уровня [7].

Посредством транскутанного газоанализа удавалось измерить локальную оксигенацию кожи и, таким образом, оценить прогноз заживления раневого дефекта. Критическим показателем считается уровень  $T_{\text{ср}}\text{O}_2 < 30$  мм рт. ст. (в норме 50–80 мм рт. ст.). В этом случае вероятность заживления язвы крайне низкая [27].

## **2.6. Исследование и оценка трофической язвы**

Визуально и по цифровой фотографии оценивали стадию раневого процесса (для исследования были отобраны больные только в стадии грануляции) и глубину раны для ранжирования по классификации Техасского университета.

Оценка площади трофической язвы проводилась в обеих группах с использованием параллельно двух методик:

1. Метод контактной планиметрии [72]. Для этого во время перевязки накладывали на язвенный дефект прозрачную стерильную полиэтиленовую пленку, обводили на ней контур язвы маркером. В дальнейшем сопоставляли пленку с листом миллиметровой бумаги и, перенося контур трофической язвы, вручную подсчитывали площадь язвы. Планиметрическое исследование выполнялось каждые 2–3 суток во время стационарного лечения пациента (рисунки 5, 6).



Рисунок 5 – Метод контактной планиметрии

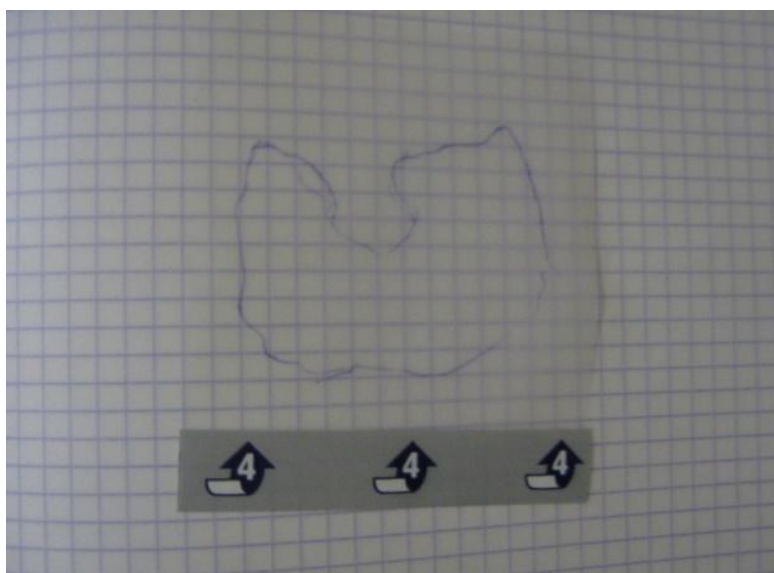


Рисунок 6 – Подсчет площади язвы

2. Метод цифровой фотосъемки. Определения площади язвы методом цифровой фотосъемки с последующим аналогичным компьютерным расчетом площадей дефекта. Для этого использовали приложение для iPhone программу – LesionMeter. Это медицинское приложение, которое измеряет площадь кожных очагов, новообразований или язв любой

формы без дополнительных инструментов. Для измерения площади фотографировали язву вместе с пластиковой картой стандартного размера (банковская карта). Обводили контур очага пальцем, и приложение само рассчитывало его площадь (рисунок 7).



Рисунок 7 – Оценка площади язвы с помощью программы LesionMeter

Для повышения объективности измерения площади трофической язвы каждый раз сравнивали показатель, полученный методом цифровой съемки и методом контактной планиметрии и в работе использовали их среднее значение.

На основании динамического исследования площади трофической язвы рассчитывали скорость ее заживления, по формуле  $V_s = (S - S_n) / t$ , используя методику Поповой Л.Н. [72]. Где  $S$  – площадь язвы до лечения,  $S_n$  – площадь при последующих измерениях,  $t$  – число дней между измерениями.

Оценка степени микробной обсемененности раны проводили по методике Батикова В.Д., Печенева В.Н. [5]. Методика исследования заключалась в следующем. Стерильным тампоном брали посев из язвенного дефекта и направляли в лабораторию. Подготовленный к посеву патологический материал (гной, раневое отделяемое) количественно заседали на питательные среды. Обязательным являлось посев на чашку с 5 % кровяным агаром, на котором возможен рост большинства аэробных (факультативно-анаэробных) возбудителей хирургической инфекции. Для количественного посева с помощью стандартной (3мм в диаметре) бактериологической петли плотную питательную среду в чашке Петри разделяли на 4 равных сектора (1–4). Полную петлю жидкого патологического материала (раневое отделяемое) заседали 40 штрихами на поверхность первого сектора. После прожигания петли производили 4 штриховых посева из сектора 1 в сектор 2 и равномерно распределяли материал во втором секторе 40 штрихами. После прожигания петли производили 4 штриховых посева из второго

сектора в третий и равномерно распределяли материал в третьем секторе 40 штрихами. После прожигания петли аналогичным образом засеивали четвертый сектор.

После 18–24 ч инкубации чашек с посевами в термостате подсчитывали количество выросших на каждом секторе питательной среды колоний микроорганизмов и по таблице определяли степень обсемененности исследуемых проб (таблица 11). Критический уровень бактерий в 1 мл исследуемого материала, по которому судили об этиологической значимости выделенного возбудителя, в большинстве случаев составляет  $10^5$ – $10^6$  (рисунки 8, 9).

Таблица 11 – Степень бактериальной обсемененности клинического материала при различных вариантах роста колоний микроорганизмов на секторах плотной питательной среды

Количество бактерий в 1 мл исследуемого материала	Число колоний на секторах			
	I	II	III	IV
Менее $10^3$	1–5			
$10^3$	10–15			
$5 \times 10^3$	20–30			
$10^4$	40–60			
$5 \times 10^4$	70–80			
$10^5$	100–150	5–10		
$5 \times 10^5$	Более 150	20–30		
$10^6$	Более 150	40–60		
$5 \times 10^6$	Более 150	100–150	10–20	
$10^7$	Более 150	Более 150	30–40	
$5 \times 10^7$	Более 150	Более 150	60–80	1–5
$10^8$	Более 150	Более 150	100–150	10–20

Морфологические свойства выделенных возбудителей изучали методом микроскопии окрашенных по Грамму мазков, приготовленных из всех разновидностей, выросших на плотных питательных средах колоний. При наличии грамвариабельности в окраске бактерий использовали тест с 3%КОН. Культуральные свойства выросших микроорганизмов изучали визуально с использованием бинокулярного стереоскопического микроскопа.

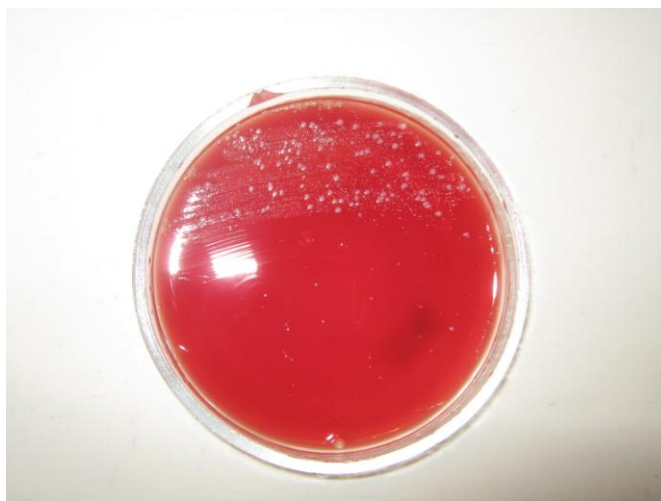


Рисунок 8 – Чашка Петри со степенью бактериальной обсемененности 10<sup>3</sup>



Рисунок 9 – Чашка Петри со степенью бактериальной обсемененности 10<sup>6</sup>

## 2.7. Статистическая обработка полученных результатов

Полученные результаты подвергались статистической обработке с сопоставлением средних показателей ( $M \pm m$ ) скорости эпителизации в обследуемых группах/подгруппах. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Достоверными принимали значения  $p < 0,05$ . Сравнительный статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера. Если  $F$  более  $F$  критич., то результаты статистически значимы. Регрессионный анализ скорости заживления трофических язв в подгруппах проводили с использованием коэффициента детерминации ( $R^2$ ): если он менее 0,5, то обоснованность такой модели сомнительна.

## **2.8. Оценка безопасности и побочных отрицательных явлений при применении дермального эквивалента**

С этой целью у пациентов после применения ДЭ изучалась динамика жалоб, при внешнем осмотре оценивались возможные аллергические проявления, измерялась температура тела для выявления гипертермической реакции, проводился контрольный стандартный клинический и биохимический анализ крови и мочи. Также выяснялось отношение пациента к применению ДЭ.

## **2.9. Этические аспекты данного клинического исследования**

Исследование было выполнено после одобрения этического комитета Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова и локального этического комитета СПбГБУЗ «Госпиталя для ветеранов войн» N 01-05/02-687 и имело характер проспективного рандомизированного.

## **2.10. Дизайн исследования**

Как видно из рисунка 10, организация проведенного исследования включала следующие, последовательно выполненные этапы: первичную оценку исходных показателей лабораторных и инструментальных исследований у больных с СДС лечившихся в Госпитале, для выделения пациентов с нейропатической и нейроишемической формой, стандартного местного и общего лечения трофических язв до стадии грануляций, последующее выделение пула участников исследования на основании критериев включения/исключения и письменного информированного согласия; проведение рандомизации с выделением исследовательских групп: группы сравнения, где проводилось стандартное общее и местное лечение язв и основной группы, где дополнительно к стандартному местному лечению язвы был применен ДЭ. Контрольные точки обследования пациентов проводились через 1, 2, 12 месяцев от начала дифференцированного лечения.



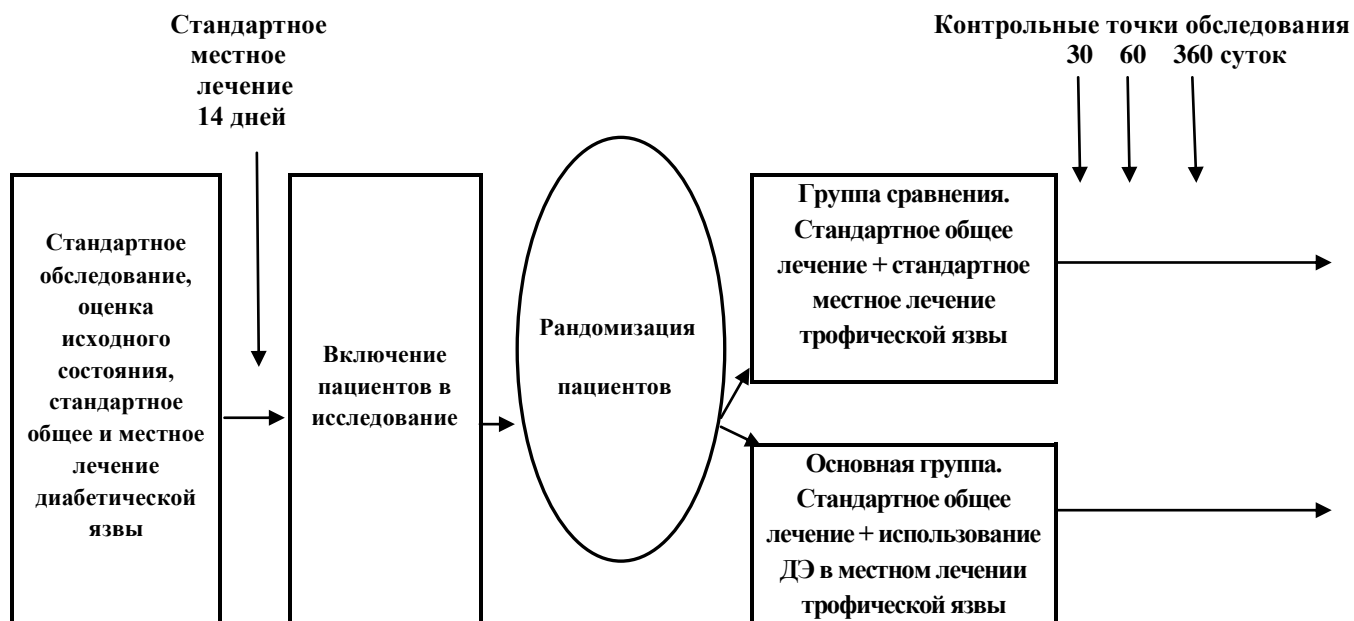


Рисунок 10 – Общая схема организации и этапов проведенного исследования

*Включение* больных в исследование происходило после стандартного клинического обследования с учетом критериев включения/исключения, установления формы СДС (нейропатическая или нейроишемическая) и определения исходной (к этому моменту) скорости заживления трофической язвы, а также перкутанного напряжения кислорода ( $T_c pO_2$ ) в коже пораженной стопы (на расстоянии 2 см от края язвы), бактериальной обсемененности поверхности язвы. Все больные к моменту начала исследования на протяжении 14 дней получали стандартное местное лечение трофической язвы. До начала исследования у всех обследованных больных, когда они находились на стандартном местном лечении, изучали исходную скорость заживления язвы, перкутанное напряжение кислорода.

*После рандомизации* пациенты разделялись на исследовательские группы и получали различное местное лечение трофических язв

*Контрольные точки и характер исследования:*

- через 1 месяц после начала лечения у всех обследованных больных изучалась скорость заживления ран, рассчитывались средние показатели ( $M \pm m$ ) для каждой группы и отдельно для каждой подгруппы;

- через 2 месяца после начала лечения у всех обследованных больных изучалась скорость заживления ран, рассчитывались средние показатели ( $M \pm m$ ) для каждой группы и отдельно для каждой подгруппы;

- через 12 месяцев после начала лечения регистрировали количество стойко полностью заживших язв, количество рецидивов после полного заживления язв, количество уменьшившихся, но не полностью заживших язв, количество язв без динамики состояния по отношению к началу исследования.

Для выявления исходных факторов, при которых применение ДЭ было неэффективно, в основной группе отдельно подвергли анализу данные пациентов, у которых скорость заживления язвы в 1 контрольной точке исследования была не выше скорости заживления в группе сравнения. Также у пациентов с полным заживлением трофической язвы и рецидивом возникновения язвы подвергли отдельному анализу факторы, которые этому могли способствовать.

У 7 пациентов было применено повторное применение ДЭ, у них дополнительно изучали скорость заживления язвы для оценки эффективности такого лечения.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Исходные (перед началом исследования) показатели лабораторного и инструментального исследования у обследованных пациентов

#### 3.1.1. Исходные показатели гликемии

Всем больным к этому моменту удалось добиться компенсации СД. Показатели гликемии распределились следующим образом (таблица 12).

Таблица 12 – Исходные средние ( $M \pm m$ ) показатели уровня глюкозы в крови в обследованных группах/подгруппах пациентов

Группы/Подгруппы пациентов	Показатели гликемии микро моль/л
Основная группа/подгруппа А	6,4–9,1 (7,7 $\pm$ 1,2)
Основная группа/подгруппа Б	6,5–9,3 (7,6 $\pm$ 1,1)
Группа сравнения/подгруппа А1	6,3–9,2 (7,6 $\pm$ 1,3)
Группа сравнения/подгруппа Б1	6,4–9,4 (7,7 $\pm$ 1,2)

Таким образом, к началу исследования достоверного различия по уровню гликемии в сравниваемых исследуемых группах (подгруппах) не было.

#### 3.1.2. Исходные показатели состояния магистрального кровообращения по данным ультразвукового ангиосканирования и ангиографии

Реваскуляризация пораженной конечности (баллонная ангиопластика и стентирование артерий нижних конечностей): выполнялась у пациентов с нейро-ишемической формой СДС (подгруппы Б и Б1): у 23 больных основной группы (76,7 %) и у 16 пациентов группы сравнения (80 %). У 6 пациентов основной группы (20 %) не удалось выполнить баллонную ангиопластику артерий нижних конечностей в связи с выраженным распространенным атеросклеротическим процессом. В группе сравнения таких пациентов было 4 (20 %). У 1 пациента основной группы (3,3 %) баллонная ангиопластика не выполнена ввиду клинически значимой диабетической нефропатии.

Показатели ЛПИ в обследованных группах/подгруппах перед началом исследования представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Исходные средние ( $M \pm m$ ) показатели лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) в обследованных группах/подгруппах пациентов

Группы/Подгруппы пациентов	Показатели ЛПИ
Основная группа/подгруппа А	0,8–1,07 (0,88±0,08)
Основная группа/подгруппа Б	0,33–0,72 (0,57±0,12)
Группа сравнения/подгруппа А1	0,81–1,06 (0,9±0,09)
Группа сравнения/подгруппа Б1	0,3–0,75 (0,58±0,13)

У 4 пациентов основной группы (6,7 %) ЛПИ был менее 0,4. В группе сравнения таких пациентов было 3 (7,5 %). Таким образом, в сравниваемых подгруппах с нейро-ишемической формой СДС показатели ЛПИ были существенно ниже нормы, но достоверно не различались между подгруппами ( $p > 0,05$ ), а в подгруппах с нейропатической формой СДС этот показатель несущественно отличался от нормы и также различия не были достоверными для сравниваемых подгрупп.

В основной группе ультразвуковые признаки посттромботической болезни вен нижних конечностей диагностированы у 5 пациентов (8,3 %) (3 пациента (10 %) подгруппа А, 2 (6,7 %) – подгруппа Б); в группе сравнения – у 3 пациентов (7,5 %) (2 подгруппа А1 (10 %), 1 подгруппа Б1 (5 %)). Варикозная болезнь диагностирована у 4 пациентов основной группы (6,7 %) (3 подгруппа А (10 %), 1 подгруппа Б (3,3 %)), и у 3 пациентов группы сравнения (7,5 %) (2 подгруппа А1 (10 %), 1 подгруппа Б1 (5 %)).

### 3.1.3. Исходные показатели перкутанного напряжения кислорода

Показатели перкутанного напряжения кислорода на пораженной стопе в исследуемых группах/подгруппах пациентов перед началом исследования распределились следующим образом (таблица 14).

Таблица 14 – Исходные средние ( $M \pm m$ ) показатели перкутанного напряжения кислорода ( $T_{cp}O_2$ ) на пораженной стопе в обследованных группах/подгруппах пациентов

Группы/Подгруппы пациентов	Показатель $T_{cp}O_2$ (мм рт. ст.)
Основная группа/подгруппа А	45–56 (50±5)
Основная группа/подгруппа Б	30–46 (41±5)
Группа сравнения/подгруппа А1	44–55 (49±5)
Группа сравнения/подгруппа Б1	30–47 (42±4)

Таким образом, исходно у всех пациентов  $TcPO_2$  был ниже нормы, в большей степени при нейроишемической форме СДС. При этом у 4 пациентов основной группы (6,7 %) показатель  $TcPO_2$  был менее 35 мм рт.ст. В группе сравнения таких пациентов было 3 (7,5 %). Как видно из этой таблицы, исходные средние показатели  $TcPO_2$  не имели достоверного различия, как в сравниваемых группах так и для сравниваемых подгрупп.

### 3.1.4. Исходная микробная обсемененность трофической язвы

К началу исследования характер флоры в исследуемых группах/подгруппах пациентов был сопоставим. Бактериальная загрязненность в основной группе у 57 пациентов (95%) была невысокой ( $<10^5$  на 1мл отделяемого). В группе сравнения невысокая бактериальная загрязненность определялась у 37 пациентов (92,5%). У 3 пациентов основной группы (5 %) была высокая степень бактериальной обсемененности раны  $>10^5$  на 1 мл отделяемого, 2 пациента подгруппы А (6,7 %), 1 пациент подгруппы Б (3,3 %). В группе сравнения таких пациентов было 3 (7,5 %), 2 (10 %) подгруппа А1, 1 подгруппа Б1 (5 %). Наиболее часто из раны высевались: *Staphylococcus aureus* (39%), *Staphylococcus epidermidis* (16%), *Klebsiella pneumoniae* (12%), *Pseudomonas aeruginosa* (7%), *Enterococcus faecalis* (6%), *Proteus mirabilis* (5%).

### 3.1.5. Исходные показатели скорости заживления трофических язв

Исходно, перед началом исследования, скорость заживления трофических язв в основной группе у пациентов подгруппы А составляла 0,061–0,191  $cm^2$  в сутки, в подгруппе Б – 0,021–0,104  $cm^2$ ; в группе сравнения у пациентов подгруппы А1 составила 0,054–0,204  $cm^2$  в сутки, в подгруппе Б1 от 0,015 до 0,107  $cm^2$  в сутки).

Таблица 15 – Исходные средние ( $M \pm m$ ) показатели скорости заживления трофических язв в обследованных группах/подгруппах пациентов

Группы/Подгруппы пациентов	Средняя скорость эпителизации $cm^2$ в сутки
Основная группа/подгруппа А	0,061–0,191 (0,127 $\pm$ 0,061)
Основная группа/подгруппа Б	0,021–0,104 (0,063 $\pm$ 0,032)
Группа сравнения/подгруппа А1	0,054–0,204 (0,134 $\pm$ 0,070)
Группа сравнения/подгруппа Б1	0,015–0,107 (0,062 $\pm$ 0,043)

Таким образом, перед началом исследования средняя скорость заживления трофических язв была достоверно выше в подгруппах с нейропатической формой СДС, по сравнению с нейроишемической формой ( $p < 0,05$ ), но между сравниваемыми подгруппами двух

исследовательских групп достоверного различия не было, что указывало на сопоставимость исходных данных.

### 3.2. Оценка скорости заживления трофических язв у обследованных пациентов после начала дифференцированного местного лечения

В основной группе у 48 (80 %) больных (из них 26 пациентов подгруппы А, 22 пациентов подгруппы Б) уже на 2-ые сутки после трансплантации ДЭ над всей поверхностью язвенного дефекта образовывалась тонкая пленка, в дальнейшем под которой появилась активная краевая эпителизация. В течение первой недели новообразованный эпителий отличался низкой устойчивостью к травматизации, что требовало бережного и атравматичного выполнения перевязок.

Скорость заживления трофических язв в течение первых 30 суток в основной группе у пациентов подгруппы А составляла 0,125–0,333 см<sup>2</sup> в сутки, в подгруппе Б 0,049–0,162 см<sup>2</sup>; в группе сравнения, соответственно, у пациентов подгруппы А1 составила 0,051–0,246 см<sup>2</sup> в сутки, в подгруппе Б1 от 0,014 до 0,109 см<sup>2</sup> в сутки).

Таблица 16 – Средние (M±m) показатели скорости заживления трофических язв в обследованных группах/подгруппах пациентов за период первых 30 суток

Группы/Подгруппы пациентов	Средняя скорость эпителизации см <sup>2</sup> в сутки
Основная группа/подгруппа А	0,125–0,333 (0,241±0,091)
Основная группа/подгруппа Б	0,049–0,162 (0,114±0,052)
Группа сравнения/подгруппа А1	0,051–0,246 (0,152±0,090)
Группа сравнения/подгруппа Б1	0,014–0,109 (0,057±0,042)

Средняя скорость заживления трофических язв в основной группе в течение первого месяца после начала использования ДЭ была достоверно ( $p < 0,05$ ) выше, по сравнению с группой сравнения для обеих сопоставляемых подгрупп и по сравнению с исходными значениями. В подгруппе А скорость заживления возросла по сравнению с исходным значением почти на 90 %, в подгруппе Б на 80%.

Вместе с тем, этот показатель был достоверно выше в основной группе в подгруппе с нейропатической формой СДС, по сравнению с нейроишемической подгруппой ( $p < 0,05$ ). В группе сравнения скорость заживления также была достоверно ( $p < 0,05$ ) выше в подгруппе с нейропатической формой СДС, но показатели достоверно не отличались от исходных значений (таблица 16, рисунок 11).

Скорость заживления трофических язв в течение вторых 30 суток в основной группе у пациентов подгруппы А составляла 0,059–0,219 см<sup>2</sup> в сутки, в подгруппе Б 0,023–0,108 см<sup>2</sup>; в группе сравнения у пациентов подгруппы А1 составила 0,049–0,211 см<sup>2</sup> в сутки, в подгруппе Б1 от 0,019 до 0,104 см<sup>2</sup> в сутки (таблица 17, рисунок 12).

Таблица 17 – Средние (M±m) показатели скорости заживления трофических язв в обследованных группах/подгруппах пациентов за период вторых 30 суток

Группы/Подгруппы пациентов	Средняя скорость эпителизации см <sup>2</sup> в сутки
Основная группа/подгруппа А	0,059–0,219 (0,133±0,069)
Основная группа/подгруппа Б	0,023–0,108 (0,065±0,035)
Группа сравнения/подгруппа А1	0,049–0,211 (0,122±0,073)
Группа сравнения/подгруппа Б1	0,019–0,104 (0,059±0,040)

В течение второго месяца после применения ДЭ, средняя скорость заживления снизилась и показатели, хотя и были несколько выше, чем в подгруппах группы сравнения, но достоверного отличия не выявлено. Это касалось почти всех больных в основной группе – 57 (95 %) пациентов. Вместе с тем, у 3-х пациентов (5 %) основной группы, подгруппы А скорость заживления и к этому периоду оставалась достоверно выше, по сравнению с группой сравнения, подгруппой А1. При сравнении средней скорости заживления между подгруппами основной группы, лучшие показатели и в этот срок были при нейропатической форме СДС. Таким образом, при однократном применении ДЭ, наблюдался период ускоренного заживления трофической язвы, по сравнению со стандартным местным лечением, который в большинстве случаев ограничивался первыми 30 сутками; в последующем скорость заживления в исследуемых группах существенно не различалась.

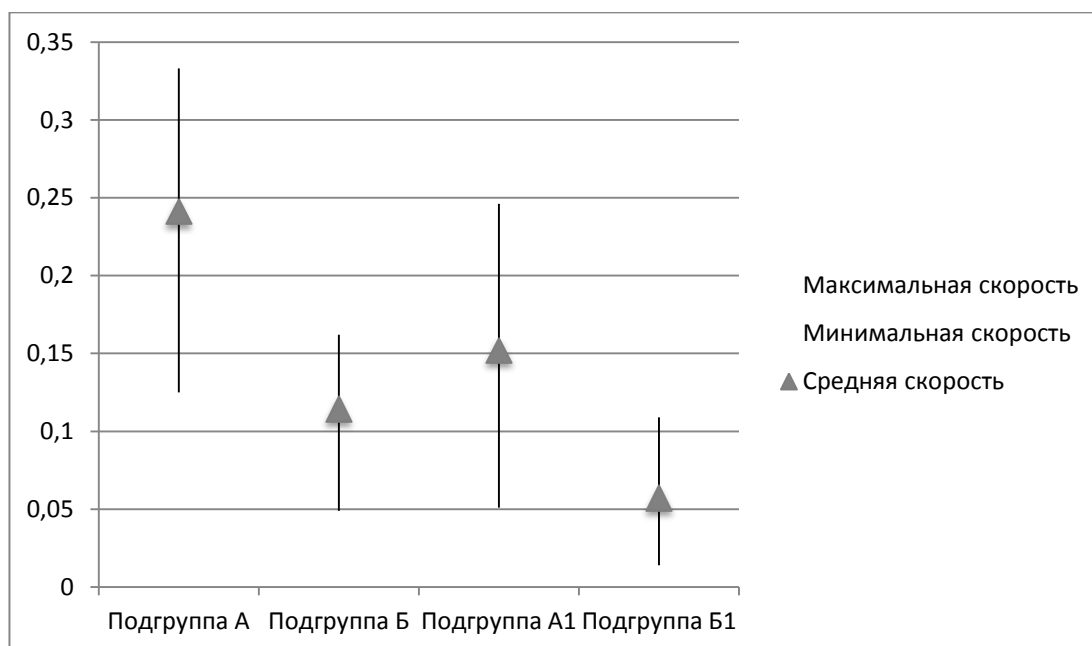


Рисунок 11 – Диаграмма максимальной, средней и минимальной скорости заживления трофических язв (см<sup>2</sup> в сутки) за период первых 30 суток после начала дифференцированного лечения в исследуемых группах/подгруппах

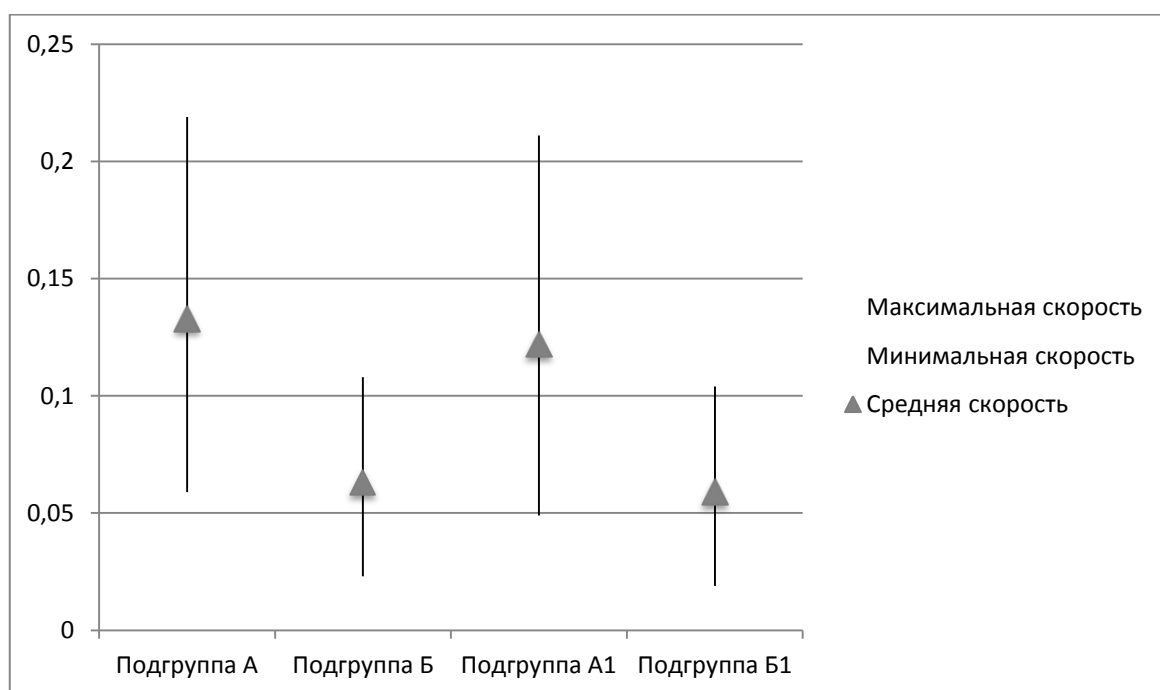


Рисунок 12 – Диаграмма максимальной, средней и минимальной скорости заживления трофических язв (см<sup>2</sup> в сутки) за период вторых 30 суток после начала дифференцированного лечения в исследуемых группах/подгруппах

### 3.3. Безопасность и побочные отрицательные явления при применении дермального эквивалента

Во всех случаях применение ДЭ не зарегистрировано каких-либо побочных отрицательных явлений; развития местных и общих аллергических реакций, гипертермической реакции, изменений со стороны стандартных анализов крови и мочи. Негативного отношения пациентов к применению ДЭ не отмечено ни в одном случае.

Ниже представлены клинические примеры эффективного применения ДЭ в местном лечении СДС.

#### Клинический пример 1.

Больная С., 75 лет поступила в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» 30.11.2015 г. с диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинонезависимый. Синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма. Трофическая язва левой стопы (Рис. 13) Язва у больной образовалась 4 месяца назад. Больная наблюдалась в кабинете диабетической стопы. Несмотря на лечение язва на фоне консервативной терапии не заживала. Больной при поступлении в СПб



ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» проведен курс консервативной терапии, выполнена ангиография артерий левой нижней конечности, где выявлен стеноз подколенной артерии до 75 % и окклюзия артерий голени. 17.12.2015 г. выполнена баллонная ангиопластика артерий левой нижней конечности. После очищения язвы и бактериологического контроля 22.12.2017 г. больной выполнена пластическое закрытие язвенного дефекта ДЭ (рисунок 14), сверху положена повязка Воскопран (рисунок 15). Больная выписана на амбулаторное лечение с чистой гранулирующей раной. В амбулаторных условиях производился мониторинг за раной (рисунок 16). Полное заживление достигнуто через 19 дней (рисунок 17).



Рисунок 13 – Трофическая язва до применения ДЭ



Рисунок 14 – Закрытие язвенного дефекта ДЭ



Рисунок 15 – Сверху положена повязка Воскопран



Рисунок 16 – Язва уменьшилась в 2 раза



Рисунок 17 – Полная эпителизация язвенного дефекта

Клинический пример 2.

Больной Д., 59 лет поступил в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» 18.02.2016 г. С диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинзависимый. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. Гнойно-некротическая язва правой стопы. Гнойный остеоартрит 4 и 5

плюснефаланговых суставов правой стопы (рисунок 18). 25.02.2016 г. выполнена ампутация 4 и 5 пальцев с резекцией головок 4 и 5 плюсневых костей (рисунок 19). Рана после ампутации очисталась, но не заживает (рисунок 20). После очищения раны и бактериологического контроля 14.03.2016 г. больному выполнена пластическое закрытие раны ДЭ (рисунок 21), сверху положена повязка Воскопран. Больной выписан на амбулаторное лечение с чистой гранулирующей раной. В амбулаторных условиях производился мониторинг за раной (рисунок 22). Полное заживление достигнуто через 2,5 месяца (рисунок 23).



Рисунок 18 – Гнойно-некротическая язва при поступлении



Рисунок 19 – Рана после ампутации 4 и 5 пальцев и резекции головок 4 и 5 плюсневых костей



Рисунок 20 – Рана перед применением ДЭ



Рисунок 21 – Закрытие раны ДЭ



Рисунок 22 – Рана уменьшилась в размерах



Рисунок 23 – Полная эпителизация язвенного дефекта через 2,5 месяца

### 3.4. Факторы, ограничивающие эффективное применение дермального эквивалента

Из 60 пациентов основной группы у 53 пациентов (88,3 %) (28 пациентов подгруппы А и 25 пациентов подгруппы Б) скорость заживления трофических язв в первые 30 суток от начала исследования достоверно превысила скорость заживления в группе сравнения (по сравнению с показателями соответствующей подгруппы), т.е. применение ДЭ было эффективным, по сравнению со стандартным лечением. У 7 пациентов основной группы (11,7%) из них у 2 пациентов подгруппы А и у 5 пациентов подгруппы Б, скорость заживления раны не превысила показатели группы сравнения, т.е. применение ДЭ не оказалось эффективным.

Для выявления факторов, препятствующих эффективному применению ДЭ, были проанализированы такие исходные показатели как:  $TcPO_2$ , ЛПИ, уровень микробной обсемененности язвы, наличие сопутствующих причин, нарушающих кровообращение в нижних конечностях.

#### а) Влияние исходного уровня $TcPO_2$ на эффективность заживления трофической язвы.

Исходные показатели  $TcPO_2$  различались в подгруппах с нейропатической и нейроишемической формах СДС и указывали на лучшую оксигенацию тканей при нейропатической форме СДС (табл. 14).

Необходимо отметить, что из 4 пациентов подгруппы Б основной группы с неэффективным применением ДЭ исходный показатель  $TcPO_2$  был во всех случаях низким и колебался от 30 до 38 ( $34 \pm 2$ ) мм рт.ст, тогда как у пациентов с эффективным применением ДЭ этот показатель был существенно выше 41–46 ( $43 \pm 2$ ) мм рт. ст. ( $p < 0,05$ ) Для нейропатической формы этот показатель исходно не был резко снижен, не было выявлено достоверной разницы в среднем показателе у пациентов с эффективным и неэффективным применением ДЭ, хотя у тех

2 пациентов, где эффекта от применения ДЭ не было  $TcPO_2$  был наиболее низкий в подгруппе. Ниже приведенный клинический пример наглядно иллюстрирует, что исходное недостаточное насыщение тканей пораженной стопы кислородом может препятствовать лечебному эффекту применения ДЭ.

Клинический пример 3.

Больной К., 59 лет находился в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» с диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинозависимый. Синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма. Трофическая язва правой стопы. После очищения язвы и бактериологического контроля больному выполнена пластическое закрытие язвы ДЭ. При расчете скорости заживления выявлено снижение репаративных процессов, размеры язвы после применения ДЭ остались прежние (рисунки 24, 25). У больного проводились адекватные методы разгрузки стопы. У больного был ЛПИ равный 0,4. Имелось нарушение микроциркуляции вследствие диабетической микроангиопатии,  $TcPO_2$  в периульценой зоне был равен 30 мм рт.ст. Скорость заживления язвенного дефекта была низкой ввиду нарушения микроциркуляции.



Рисунок 24 – Трофическая язва перед применением ДЭ



Рисунок 25 – Трофическая язва после применения ДЭ

*б) Влияние исходного уровня ЛПИ на эффективность заживления трофической язвы.*

Исходные показатели ЛПИ также отличались в подгруппах с нейропатической и нейроишемической формой СДС, указывая на лучшую оксигенацию тканей при нейропатической форме СДС (табл. 13).

У 4 (6,7 %) пациентов основной группы, подгруппа Б с неэффективным применением ДЭ исходный ЛПИ во всех случаях был менее 0,4 и колебался от 0,33 до 0,41 ( $0,35 \pm 0,02$ ), тогда как у пациентов с эффективным применением ДЭ этот показатель был существенно выше 0,59–0,72 ( $0,65 \pm 0,06$ ) ( $p < 0,05$ ). У 1 пациента, где эффекта от применения ДЭ не было, ЛПИ был наиболее низкий в подгруппе. В группе сравнения пациентов с ЛПИ менее 0,4 было 3 (7,5 %). В подгруппах с нейропатической формой СДС показатель ЛПИ несущественно отличался от нормы и различия не были достоверными для сравниваемых подгрупп. Также отмечено, что исходные показатели ЛПИ хорошо коррелировали со значением исходного  $TcPO_2$ .

Анализ пациентов основной группы, где применение ДЭ не дало эффекта, показал, что у 4 пациентов (подгруппа Б) были проявления критической ишемии: низкие показатели  $TcPO_2$  менее 35 мм рт. ст., ЛПИ менее 0,4, а по данным ангиографии у них имелась высокая окклюзия (поверхностной бедренной, общей бедренной, подвздошных артерий), но выполнение хирургической реваскуляризации у них выполнить не было возможности. Результаты исследования показали, что во всех случаях эффективного применения ДЭ исходный показатель  $TcPO_2$  у пациентов был более 35 мм рт. ст., а ЛПИ более 0,4. Ниже приведенный пример хорошо иллюстрирует обнаруженную закономерность.

Клинический пример 4.

Больной С., 69 лет находился в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» с диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинонезависимый. Синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма. Трофическая язва правой стопы. После очищения язвы и бактериологического контроля больному выполнена пластическое закрытие язвы ДЭ. Больному реваскуляризация не выполнена ввиду выраженного распространенного атеросклеротического процесса артерий правой нижней конечности. Больному выполнен курс консервативной терапии, включая препарат Вазапостан 0,6 в/в капельно, 10 дней. У больного имелись признаки критической ишемии: ЛПИ был равен 0,35. ТсРО<sub>2</sub> был равен 0,34 мм рт. ст. После применения ДЭ у больного появились фокусы вторичных некрозов в дне раны (рисунки 26–28).



Рисунок 26 – Трофическая язва перед применением ДЭ



Рисунок 27 – Трофическая язва с нанесенным ДЭ





Рисунок 28 – Трофическая язва после применения ДЭ

в) *Влияние исходного уровня бактериальной обсемененности на эффективность применения ДЭ.*

К началу исследования у 3 пациентов основной группы (5 %) была выявлена высокая степень бактериальной обсемененности раны  $>10^5$  на 1 мл отделяемого, 2 пациента подгруппы А (6,7 %), 1 пациент подгруппы Б (3,3 %). В группе сравнения таких пациентов было также 3 (7,5%), 2 (10%) подгруппа А1, 1 подгруппа Б1 (5 %).

У этих 3 пациентов основной группы после применения ДЭ размеры язвы оказались прежними, на третьей перевязке появились налеты фибрина в дне, и усилилось серозное отделяемое из язвы. Вместе с тем, по данным обследования, кровообращение в нижних конечностях в этих случаях было компенсировано. Был достаточный ЛПИ, он колебался от 0,55 до 0,7 ( $0,62 \pm 0,07$ ). Показатели  $TcPO_2$  составили от 41 до 50 ( $45 \pm 4$ ) мм рт. ст.

Снижение скорости заживления язв, видимо, было обусловлено высокой степенью бактериальной обсемененности язвы ( $>10^5$  на 1 мл отделяемого) до аппликации ДЭ, тогда как во всех случаях эффективного применения ДЭ микробная обсемененность раны была ниже  $10^5$  на 1 мл. Значение этого фактора иллюстрирует ниже приведенный клинический пример.

Клинический пример 5.

Больная Д., 48 лет находилась в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» с диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинозависимый. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. Трофическая язва левой стопы. У больной не было нарушения макро- и микроциркуляции, ЛПИ был равен 0,7.  $TcPO_2$  был равен 0,54 мм рт. ст. На фоне консервативной терапии язва очистилась. Выполнялась адекватная разгрузка стопы. Перед применением ДЭ выполнено бактериологическое исследование. Выявлен *St.Aureus*  $10^6$ . Больной применен ДЭ (рисунок 29). После применения ДЭ у больного появились налеты

фибрина в дне язвы и усилилось отделяемое, размеры язвы остались прежние (рисунок 30). Скорость заживления была низкой ввиду высокой бактериальной обсемененности язвы.



Рисунок 29 – Трофическая язва с нанесенным ДЭ



Рисунок 30 – Трофическая язва после применения ДЭ

г) *Влияние сопутствующей патологии, нарушающей кровообращение в нижних конечностях, на эффективность применения ДЭ.*

*Хроническая венозная недостаточность.* В основной группе ультразвуковые признаки посттромботической болезни вен нижних конечностей диагностированы у 5 пациентов (8,3 %) (3 пациента (10 %) подгруппа А, 2 (6,7 %) – подгруппа Б); в группе сравнения – у 3 пациентов (7,5 %) (2 подгруппа А1 (10 %), 1 подгруппа Б1 (5 %)). Варикозная болезнь диагностирована у 4 пациентов основной группы (6,7 %) (3 подгруппа А (10 %), 1 подгруппа Б (3,3 %), и у 3 пациентов группы сравнения (7,5 %) (2 подгруппа А1 (10 %), 1 подгруппа Б1 (5 %)).

У больных с хронической венозной недостаточностью на фоне посттромботической и варикозной болезней нижних конечностей диагностированы значимые отеки нижних конечностей. У всех этих пациентов артериальное кровообращение в нижних конечностях было

компенсировано. Были достаточны ЛПИ и ТсРО. Степень микробной обсемененности у всех пациентов была низкой ( $>10^5$  на 1 мл отделяемого).

Скорость заживления трофических язв у пациентов с хронической венозной недостаточностью в основной группе у пациентов подгруппы А составляла 0,125–0,236 см<sup>2</sup> в сутки, в подгруппе Б 0,049–0,121 см<sup>2</sup>; в группе сравнения у пациентов подгруппы А1 составила 0,059–0,195 см<sup>2</sup> в сутки, в подгруппе Б1 от 0,024 до 0,98 см<sup>2</sup> в сутки, т.е. была ниже чем средние показатели в группах/подгруппах.

Среди пациентов с неэффективным применением ДЭ у 3 человек имелись признаки хронического отека нижней конечности вследствие посттромботической болезни, при этом отек у них был наиболее выраженный по сравнению со всеми другими случаями ХВН, которые встречались у пациентов и при эффективном применении ДЭ.

Клинический пример 6.

Больной У., 46 лет находился в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» с диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинонезависимый. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. Трофическая язва правой стопы. Посттромботическая болезнь, отечная форма. После очищения язвы и бактериологического контроля больному выполнена пластическое закрытие язвы ДЭ. При расчете скорости заживления выявлено снижение репаративных процессов. Показатели макрогемодинамики и микроциркуляции находились в пределах нормы. Скорость заживления язвы была низкой ввиду отека нижних конечностей на фоне посттромботической болезни.

*Железодефицитная анемия.* У 5 пациентов основной группы (8,3 %) (4 пациента подгруппа А (13,3 %), 1 пациент подгруппы Б (3,3 %)) диагностирована железодефицитная анемия. У 2-х пациентов основной группы, подгруппы А (6,7 %) анемия была, средней степени тяжести. У 6 пациентов группы сравнения (15 %) (4 пациента подгруппы А1 (20 %) и 2 пациента подгруппы Б1 (10 %)) хроническая анемия была легкой степени тяжести.

У 2-х пациентов основной группы, подгруппы А с анемией средней степени тяжести отмечена более низкая скорость заживления трофических язв, составляла 0,131–0,166 см<sup>2</sup> в сутки. У этих пациентов был достаточный ЛПИ, равный 0,7–0,8. Показатели ТсРО<sub>2</sub> были не высокие 0,46–0,48 мм рт. ст. У пациентов с анемией легкой степени тяжести скорость заживления язв достоверно не отличалась в сопоставимых подгруппах.

Среди пациентов основной группы с неэффективным применением ДЭ как раз и были те 2 больных, у которых зарегистрирована анемия средней степени тяжести. В группе с эффективным применением ДЭ таких больных не было.

*Ожирение.* Избыточная масса тела (ожирение) также могло оказывать отрицательную роль на эффективность применения ДЭ, о чем свидетельствует приводимый ниже клинический пример 7.

Больной Б., 70 лет находился в СПб ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» с диагнозом: Сахарный диабет 2 типа, инсулинонезависимый. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма. Ожирение 3 степени. Трофическая язва левой стопы. У больного был достаточный ЛПИ равный 0,75. Показатель  $TcPO_2$  был 0,51 мм рт. ст. Производилась адекватная разгрузка стопы с использованием кресла-коляски и костылей. После очищения язвы и бактериологического контроля больному выполнена пластическое закрытие язвы ДЭ. При расчете скорости заживления выявлено снижение репаративных процессов. Показатели макрогемодинамики и микроциркуляции находились в пределах нормы. Скорость заживления была низкой и составила  $0,150 \text{ см}^2$  в сутки.

Таким образом, ввиду ожирения 3 степени у больных с нейропатической формой скорость заживления трофических язв снижается, вследствие повышенного плантарного давления, даже при адекватной разгрузки стопы.

Перечисленные исходные факторы оказывали негативное влияние на эффективность применения ДЭ.

В основной группе самая высокая скорость заживления была у тех пациентов, у которых была низкая бактериальная обсемененность, достаточный ЛПИ и напряжение кислорода, отсутствовали сопутствующие заболевания вен и хронический отек нижних конечностей.

### **3.5. Отдаленные результаты (12 месяцев наблюдения)**

При наблюдении за больными в сроки до 12 месяцев было отмечено следующее: в основной группе после первичного применения ДЭ удалось полностью заживить раневой дефект у 46 пациентов (76,6 %) – 26 пациентов подгруппы А (86,6 %) и 20 пациентов подгруппы Б (66,7 %). Сроки заживления составили от 31 до 110 дней (в среднем  $77 \pm 11$  суток). Как правило, это были пациенты с небольшой площадью раневого дефекта от 1 до  $11 \text{ см}^2$  (в среднем  $6 \pm 3 \text{ см}^2$ ). Отмечено, что первый месяц идет активная эпителизация, и язвенный дефект сокращается на 70 %, затем, хотя скорость заживления существенно уменьшается, но тем не менее язвенный дефект эпителизует в сроки до 3-х месяцев. Уменьшение раны без полного заживления в эти сроки в основной группе отмечено у 7 пациентов, отсутствие динамики в заживлении – у 7 пациентов.

В группе сравнения результаты в эти сроки наблюдения были следующие: полное заживление удалось достичь у 25 пациентов (62,5 %) (15 пациентов подгруппы А1 (75 %),

10 пациентов подгруппы Б1 (50%)), но сроки были значительно дольше, чем в основной группе: 112–305 суток (в среднем  $145 \pm 36$  суток). Уменьшение раны без полного заживления в эти сроки в группе сравнения отмечено у 8 пациентов; отсутствие динамики в заживлении – у 7 пациентов.

Полное заживление не достигнуто у 15 (37,5 %) пациентов (5 из подгруппы А1 (25 %), 10 – из подгруппы Б1 (50 %) (таблица 18).

Таблица 18 – Количество случаев (в процентах) с полным заживлением трофической язвы в обследованных группах/подгруппах больных в сроки наблюдения 12 месяцев от начала дифференцированного лечения

<b>Группы/Подгруппы пациентов</b>	<b>Процент полностью заживших язв</b>	<b>Всего</b>
Основная группа/подгруппа А	86,6 %	76,6%
Основная группа/подгруппа Б	66,7 %	
Группа сравнения/подгруппа А1	75 %	62,5%
Группа сравнения/подгруппа Б1	50 %	

Таким образом, в основной группе, как для подгруппы с нейроишемической, так и подгруппы с нейропатической формой СДС, сроки полного заживления трофической язвы были короче, а процент заживших язв больше на 14,1%, чем в группе сравнения.

У 4 пациентов основной группы (8,7 %) с полностью зажившей трофической раной в сроки от 65 до 128 суток возник рецидив язвы (2 пациента из подгруппы А (7,7 %), 2 пациент из подгруппы Б (10 %). У больных группы сравнения рецидив язвы отмечен у 6 пациентов (24 %) в сроки от 41 до 120 суток (3 пациента из подгруппы А1 (20 %), 3 пациента из подгруппы Б1 (30 %) (таблица 19).

Таблица 19 – Количество рецидивов (в процентах) трофической язвы после ее полного заживления в обследованных группах/подгруппах в сроки наблюдения 12 месяцев от начала дифференцированного лечения

<b>Группы/Подгруппы пациентов</b>	<b>Процент рецидива заживших язв</b>	<b>Всего</b>
Основная группа/подгруппа А	7,7 %	8,7 %
Основная группа/подгруппа Б	10 %	
Группа сравнения/подгруппа А1	20 %	24%
Группа сравнения/подгруппа Б1	30 %	

Как видно из табл.19, количество случаев рецидива трофической язвы в основной группе в целом и для каждой сравниваемой подгруппы отдельно было ниже на 15,3% в основной группе по отношению к группе сравнения.

Анализ причин рецидива трофической язвы показал, что у части больных это было связано с декомпенсацией сахарного диабета, у части с механической травмой этой зоны, у остальных с прогрессированием нарушения артериального кровообращения в нижних конечностях. Эти же причины затрудняли полное заживление трофических язв.

#### *Повторное применение ДЭ*

У 7 пациентов основной группы (11,7 %) (2 пациента подгруппы А (10 %), 5 пациента подгруппы Б (25 %) в связи со снижением скорости и большими по площади язвенные дефекты от 12 до 25 см<sup>2</sup> (в среднем 17±5 см<sup>2</sup>) в сроки от 90 до 120 суток была повторно выполнена аппликация ДЭ (после оценки уровня микробной обсемененности раны и кровоснабжения тканей и признания их удовлетворяющими критериям применения ДЭ), при этом удалось добиться полного заживления раневого дефекта у 4-х из 7 пациентов (57,1 %) (2 пациента подгруппы А, 2 пациент подгруппы Б). У 3-х пациентов (все подгруппы Б) основной группы, даже после повторного применения ДЭ, полностью заживить раневой дефект так и не удалось, хотя его размеры значительно уменьшились. Специального исследования скорости заживления трофической язвы в этих случаях не производилось, ввиду малого количества больных.

#### *Необходимость в ампутациях.*

В указанные сроки наблюдения в основной группе 2 пациентам (3,3 %) выполнены малые ампутации (ампутация пальца стопы). Это были пациенты с нейропатической формой СДС, у которых возник рецидив язвы, развился прогрессирующий остеомиелит костей пальца. В группе сравнения у 6 пациентов (15 %) выполнены ампутации как малые – пальцев, так и на уровне верхней трети голени (таблица 20).

Таблица 20 – Количество (в процентах) и характер ампутаций в обследуемых подгруппах больных в сроки наблюдения 12 месяцев от начала дифференцированного лечения

<b>Группы/Подгруппы пациентов</b>	<b>Процент ампутаций в подгруппе</b>	<b>Всего</b>	<b>Уровень ампутаций</b>
Основная группа/подгруппа А	6,7 %	3,3%	2 ампутации пальцев стопы
Основная группа/подгруппа Б	0 %		

Группа сравнения/подгруппа А1	15 %	15%	2 ампутации пальцев стопы
			1 ампутация в/3 голени
Группа сравнения/подгруппа Б1	15 %		2 ампутации пальцев стопы
			1 ампутация в/3 голени

Таким образом, в сроки наблюдения 12 месяцев в основной группе пациентов число и тяжесть ампутаций были существенно ниже на 11,7%, чем в группе сравнения.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в исследовании результаты продемонстрировали, что еще исходно показатели скорости заживления язвенной поверхности были достоверно выше при нейропатической форме СДС, по сравнению с нейроишемической формой. Это объясняется, лучшим исходным кровоснабжением стопы (как притока артериальной крови, так и доставки кислорода к тканям): практически у всех больных с нейропатической формой СДС не был снижен ЛПИ,  $TcPO_2$  также был в пределах нормы или несущественно снижен, тогда как у больных нейроишемической формой СДС эти показатели были значительно снижены, вплоть до признаков критической ишемии у части пациентов. Исходно у большинства пациентов с СДС в обеих группах суточная скорость заживления была незначительная.

Современный уровень знаний о патофизиологии длительно незаживающих ран, к числу которых относятся язвы при СДС, среди факторов, препятствующих заживлению особое значение придает повышенной секреции и активности матриксных металлопротеаз, с одновременным уменьшением содержания их ингибиторов. Матриксные протеазы деградируют внеклеточный матрикс, служащий основой для прикрепления и миграции клеток в процессе эпителизации. При этом разрушаются и тканевые факторы роста, которые связаны с матриксом, что является ведущим моментом данной патологии. Кроме того, открытые раны способствуют проникновению бактерий, что приводит к дополнительному микробному обсеменению и формированию в ране хронического воспаления. Также при СДС фибробласты, основной клеточный материал для репарации, являются по фенотипу «стареющими», демонстрируют низкую миграционную и пролиферативную способность, а также склонность к апоптозу [68,146]. Таким образом, в случае хронических ран и трофических язв необходима стимуляция процессов заживления, формирование элементов внеклеточного матрикса, миграции клеток в рану, восполнения нехватки ростовых факторов и стимуляции регионарного кровообращения. Чтобы активировать эти процессы, необходим ряд ростовых факторов, источником которых являются сами клетки кожи в составе эквивалентов кожи.

Применение ДЭ у больных с СДС в стадию грануляции показало, что в первые 30 суток процессы заживления трофической язвы достоверно ускоряются по сравнению со стандартным лечением.

Использованные в данном исследовании для клеточной терапии трофических язв культивированные фибробласты в составе ДЭ являются достаточно простым продуктом: их можно легко получить и культивировать, даже в трехмерном матриксе. Эти клетки, хотя и являются аллогенными, характеризуются большим пролиферативным потенциалом. Они способны сохранять нормальный диплоидный кариотип при культивировании, а также



секретировать большое количество элементов внеклеточного матрикса, цитокинов и ростовых факторов, которые положительно влияют на пролиферацию собственных клеток пациента, таких как фактор роста кератиноцитов (KGF) и фибробластов (bFGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ряд других [85,199]. Доказано, что фибробласты способны стимулировать регенерацию кожи при заживлении как острых, так и хронических ран, тем самым способствуют краевой и островковой эпителизации. Дermalные эквиваленты, которые транспортированы в область хронических ран, нормализуют трофику поврежденной области, а также являются источником дермальных компонентов, таким образом восстанавливая нормальное микроокружение раневого ложа и баланс между разрушением и синтезом элементов внеклеточного матрикса [85].

Эффективность применения ДЭ ранее была показана при трофических язвах венозной этиологии, даже без предшествующего хирургического устранения патологического вертикального и горизонтального рефлюкса, что доказывало выраженный репаративный потенциал этой технологии лечения [60]. Факт закрытия язвенного дефекта достигал 99,1 %, по сравнению с традиционной терапией (66,7 %). Скорость эпителизации при варикозной болезни и язвах площадью до 12 см<sup>2</sup> составила 15,8 % в сутки, в группе сравнения 6,7 % в сутки [47]. В другом исследовании эти язвы эпителизировали со скоростью 12,9 % в сутки, в группе сравнения – 6,3 % в сутки [74].

Выявленная в данном исследовании скорость заживления диабетических трофических язв при применении ДЭ оказалась ниже, чем при венозных трофических язвах, что объясняется значительно более значительными нарушениями доставки кислорода к тканям и микроциркуляции при СДС.

Полученные нами результаты, согласуются с литературными данными по применению зарубежных аналогов ДЭ.

В зарубежной литературе наиболее изученными клеточными продуктами являются Dermagraft и Apligraf.

Dermagraft был одобрен в США как медицинское устройство класса III для использования при лечении трофических язв при СДС, продолжительностью более 6 недель, которые распространяются через всю дерму, но без вовлечения сухожилий, мышечной ткани, суставной капсулы или кости. Dermagraft используется при адекватном кровоснабжении тканей, в сочетании со стандартными схемами лечения трофических язв при СДС [134].

Ряд авторов показали более высокую эффективность лечения нейропатических язв СДС по сравнению со стандартным лечением.

В многоцентровом рандомизированном контролируемом исследовании оценивали эффективность клеточного продукта в сочетании со стандартной терапией для лечения

неинфицированных язв при нейропатической форме СДС. Язвы существовали по меньшей мере в течение двух недель. Их сравнивали только со стандартной терапией. В итоге полная эпителизация язв при использовании клеточного продукта Apligraf за 12 недель произошла у 55,2 % больных. Полная эпителизация в контрольной группе отмечена у 34,3 % больных. И при использовании Apligraf была более высокая скорость заживления трофических язв [121].

В данном исследовании было обнаружено, что возрастание скорости заживления при применении ДЭ, по сравнению со стандартным лечением, сохранялась в большинстве случаев в течение первых 30 суток, затем показатель снижался и достоверно не отличался от группы сравнения. Это может объясняться следующим обстоятельством: по данным литературы в случае пересадки аллогенного материала истинного приживления эквивалента не происходит [12]. Аллотрансплантат является временным биологически активным покрытием, клетки его замещаются клетками реципиента в течение нескольких недель [81]. Схожие результаты были получены и для аналогичных зарубежных раневых покрытий. Так при применении препарата Apligraf аллогенные фибробласты уже через 6 недель после нанесения не удается обнаружить в ране. Apligraf и Dermagraft использовали 1 раз в неделю до полной эпителизации, полученные результаты оценивали через 8 и 12 недель. К этому моменту в группе, где применяли продукты клеточной терапии, полной эпителизации язв удалось добиться у 56 % пациентов по сравнению с 38 % в контроле, при этом сроки заживления составили 65 и 90 дней соответственно [85].

Ранозаживляющее действие эквивалента кожи основано на том, что фибробласты оказывают стимулирующее воздействие на клетки кожи пациента, а коллагеновый матрикс служит готовой подложкой, по которой возможна миграция клеток [36]. Поскольку, фибробласты являются аллогенными, то вскоре погибают, и этим, вероятно, объясняется, факт существенного снижения скорости заживления спустя месяц после начала использования ДЭ.

В проведенном исследовании было показано, что эффективность применения ДЭ может быть ограничена рядом исходных факторов.

У пациентов с исходным низким показателем  $TcPO_2$  (<35 мм.рт. ст) применение ДЭ оказалось неэффективным. По данным литературы в патогенезе СДС большую роль играют нарушения микроциркуляции. При СД имеются определенные нарушения микроциркуляции, которые можно охарактеризовать как изменения ауторегуляции тонуса сосудов и кровотока, а также повышением проницаемости сосудистой стенки. Нарушения реологических свойств крови и системы гемостаза являются важнейшей причиной ухудшения микроциркуляции при СДС. Поскольку, у больных с диабетической нейропатией объем шунтирующего кровотока достигает более 95 %, это приводит к своеобразному «феномену обкрадывания» нутритивных капилляров, поэтому тканевая перфузия снижается. Считается, что гипоперфузия тканей

способствует развитию гипоксии, тем самым препятствуя регенерации тканей, замедляет процесс заживления диабетических язв, и имеет значение в процессе их образования. У больных СД вследствие повышенной проницаемости сосудов, внутрикапиллярной гипертензии, гемодинамических расстройств распространена склонность к формированию отеков нижних конечностей. Ангио- и нейропатия приводят к нарастанию процессов гипоксии и ишемии тканей, тем самым превращают компенсаторную сосудистую реакции в патологическую за счет раскрытия и последующего паралича артериовенозных шунтов [91].

Также у пациентов с низким исходным ЛПИ (менее 0,4) применение ДЭ не дало результата.

Микро- и макроангиопатия при СД являются патогенетическими компонентами поражения сердечно-сосудистой системы. Проявлением микроангиопатии является повышение проницаемости сосудистой стенки, нарушение реактивности и ауторегуляции в артериолах и капиллярах. Макроангиопатия является одной из причин развития хронических язвенных поражений и некроза мягких тканей, в основе которой лежит атеросклеротическое поражение периферической сосудистой стенки нижних конечностей. При СД атеросклеротическое поражение артерий имеет характерные особенности: развивается в более молодом возрасте, быстро прогрессирует, поражение, как правило, симметричное, с вовлечением нескольких сегментов (бедренно-подколенный сегмент, артерии голени, стопы). Частота формирования атеросклероза артерий нижних конечностей у женщин и мужчин одинакова, в то время как у лиц без СД атеросклеротическое поражение сосудов преимущественно у мужчин. Макроангиопатию современные исследователи не рассматривают как основную причину СДС, однако, нельзя недооценивать значимость облитерирующего атеросклероза. Диабетическая макроангиопатия обусловлена атеросклерозом Менкенберга и диффузным фиброзом интимы. Антитромбогенная активность эндотелиальной сосудистой стенки достоверно ниже при наличии диабетической нейропатии. Снижение перфузионного давления в микрососудистом русле на фоне как магистрального, так и капилляров приводит к развитию патологических изменений и в итоге к некротическим изменениям в мягких тканях [82]. Поэтому у больных с критической ишемией (ЛПИ <0,4) появлялись фокусы вторичных некрозов в дне раны даже после применения ДЭ. У тех пациентов, где после хирургической реваскуляризации удалось повысить показатель ЛПИ применение ДЭ, как правило было эффективным.

Пересадка клеточного материала в фазу экссудации нецелесообразна и обречена на неудачу. Так как продукты клеточных технологий являются чувствительными к агрессивному воздействию протеаз и микробным агентам. Такие язвенные дефекты нуждаются в подготовке к пересадке, и должны включать медикаментозную терапию, удаление некротически измененных тканей и деконтаминацию язвы от патогенной микрофлоры, стимуляцию репаративных

процессов. Переход раневого процесса в фазу пролиферации, является ожидаемым положительным результатом первичного курса лечения. Поэтому такие продукты используются в фазе репарации, они способствуют не очищению, а закрытию раны [47,85]. Именно поэтому применение ДЭ у пациентов с высокой степенью бактериальной обсемененности оказалось неэффективным.

В проведенном исследовании было обнаружено, что наличие у пациентов исходно ряда заболеваний, неблагоприятно влияющих на кровообращение в нижних конечностях, отрицательно сказывалось при использовании ДЭ. Это логично и вполне согласуется с действием пониженных показателей ЛПИ и  $TcPO_2$ .

Так избыточная масса тела (ожирение) способствует механическому стрессу в условиях снижения чувствительности и перераспределения давления на стопе [82]. У пациентов с избыточной массой тела скорость заживления трофических язв снижается, вследствие повышенного плантарного давления, даже при адекватной разгрузки стопы.

У больных с ХВН после применения ДЭ скорость заживления трофических язв была не высокой (ниже, чем в исследуемых подгруппах).

При оценке генеза поражения следует оценить выраженность проявлений хронической сердечной недостаточности, а также выраженность нарушений венозного кровотока на конечности, которые при минимальном поражении артерий вносят значимый вклад в нарушение кровоснабжения тканей стопы и препятствовать заживлению язвенных дефектов [35].

Степень нарушения венозного и артериального кровообращения имеют решающее значение в заживлении язв, обусловленных ХВН. Венозный стаз, нарушение микроциркуляции и гипоксия тканей, хронический лимфостаз, являются основными причинами, которые сдерживают процесс эпителизации. Поэтому до нанесения на язву, в процессе нанесения и в раннем послеоперационном периоде следует продолжать интенсивную многокомпонентную терапию ангиопротекторами, веноotonиками, дезагрегантами, антиоксидантами[47].

Скорость заживления при анемии средней степени тяжести, также была не высокой.

При анемии в организме нарушаются окислительные процессы и развивается гипоксия тканей. Анемия усугубляет уже имеющиеся нарушения микроциркуляции при СДС. Метаболические и нейрорегуляторные нарушения лежат в основе расстройств микроциркуляции у больных СД. Именно нейропатия приводит к начальным функциональным изменениям в системе микроциркуляции, которые предваряют структурные расстройства. Потеря нейрогенного контроля над прекапиллярами ведет к их сужению и изменению гидростатического давления и, таким образом, – к нарушению фильтрации жидкости и нутриентов. Автономная нейропатия является причиной паралитического расширения

артериоло-веноулярных шунтов и значительного повышения кровотока в них. Артериоло-веноулярные шунты, хорошо развиты на нижних конечностях, проходят параллельно микроциркуляторной сети и не участвуют в питании тканей. Через них осуществляется сброс артериализированной крови в венозную систему, то есть происходит обкрадывание кровотока в микроциркуляторном русле. R. Goldenberg детально охарактеризовал изменения мелких сосудов нижних конечностей у диабетиков. Именно он первым указал на пролиферацию эндотелия, а также на специфичное утолщение базальной мембраны с отложением PAS-положительных веществ. С возрастом концентрация глюкозы в крови и инсулиннезависимых тканях происходит ослаблением антиоксидантной системы, повышение уровня свободных радикалов, а также накоплением продуктов распада липидного и белкового обмена, которые обуславливают возникновение синдрома эндогенной интоксикации и приводят к активации процессов коагуляции, тромбозу и развитию ишемии [26].

В проведенном исследовании применение ДЭ у больных с СДС в сроки наблюдения до 12 месяцев давало лучшие результаты по сравнению со стандартным лечением: меньше рецидивов и меньший процент ампутаций.

Регенерация ран подразумевает 2 типа биологических процессов, которые могут спровоцировать патологическое заживление: отек и грануляции. Они являются нормальными и обуславливают системные события – адаптацию и морфогенез. При патологическом пути заживления ран эти два главных феномена, зависящих от клеток (в основном фибробластов) и продукции ими молекул основного вещества и волокон межклеточного вещества, отклоняются от нормы. Если продукция межклеточного вещества интенсивна, а ферментов, разрушающих его избыток недостаточна, развивается грубый гипертрофический рубец. Если созревание межклеточного вещества неполное, то это проявляется келоидным рубцом. Фибробласты мигрируют из окружающей дермы в рану на 4-е сутки, где начинают синтезировать большое количество белков внеклеточного матрикса, различных факторов роста и ферментов. После наработки коллагенового матрикса большая часть фибробластов разрушается за счет апоптоза и происходит постепенный переход от грануляционной ткани к формированию рубца [20]. Исследования ряда авторов выявило, что общее количество фибробластов и их пролиферативная способность в дерме кожи взрослого человека относительно не велики и с возрастом прогрессивно уменьшаются [109]. Введение в рану активных фибробластов изменяет сроки заживления и меняет характеристики рубца в лучшую сторону [86]. Следовательно, благодаря лучшим морфологическим характеристикам новообразованного эпидермиса, уменьшается процент рецидивов язв, и тем самым снижается риск ампутаций. В рандомизированном контролируемом исследовании сравнивали клеточный продукт с фибробластами, плюс традиционная терапия, с только традиционной терапией для лечения язв

при синдроме диабетической стопы. Частота ампутации в группе с применением фибробластов составила 5,5 %, и 12,6 % для пациентов, получавших традиционную терапию. Из 28 случаев ампутации 27 предшествовала инфекция, вызванная язвой. Авторы сделали вывод, что было значительно меньше ампутации/резекции костей у пациентов, которые получали клеточный продукт с фибробластами по сравнению со стандартной терапией, что, вероятно, связано с более низкой частотой инфекционных побочных явлений, наблюдаемых в группе лечения дермального эквивалента [137].

Как показало проведенное исследование, повторное применение ДЭ вновь ускоряет скорость заживления трофических язв.

Внесенные в рану «свежие» фибробласты вновь начинают продуцировать все основные компоненты межклеточного матрикса — гликозаминогликаны, коллаген, протеогликианы, а также отвечают за непрерывный процесс ремоделирования матрикса [92]. Трансплантированные фибробласты восстанавливают нормальное микроокружение раневого ложа, способствуют нормализации трофики поврежденных тканей и баланс между протеолизом и секрецией элементов внеклеточного матрикса [85]. Тем самым вновь ускоряется процесс закрытия дефектов кожи.

Для достижения оптимального эффекта от применения продуктов клеточных технологий, необходимо рассматривать данную терапию в контексте комплексного лечения. В данном контексте необходимо учитывать несколько аспектов: адекватную терапию основного заболевания и выявление основных причин образования язвы, критерии выявления пациентов, оптимальную сопроводительную терапию, подготовку язвенной поверхности, контроль инфекции. Перед трансплантацией на трофическую язву клеточного продукта ее необходимо подготовить. В случае трансплантации дермальных эквивалентов некоторые авторы рекомендуют медикаментозную коррекцию проявлений хронической венозной недостаточности, удаление некротически измененных тканей, деконтаминацию язвы от патогенной микрофлоры и стимуляцию образований грануляций [47].

Таким образом, полученные в исследовании результаты продемонстрировали, что применение ДЭ в стадию грануляции при СДС, особенно при нейропатической форме, обеспечивает более быстрое заживление, чем стандартное местное лечение, но терапевтический эффект ограничен во времени и зависит от ряда исходных факторов. Кроме того, применение ДЭ, дает лучшие отдаленные результаты (в сроки наблюдения 12 месяцев).

## ВЫВОДЫ

1. В течение первого месяца после однократного применения ДЭ у больных с СДС в стадию грануляции язвенного дефекта скорость заживления повышается, по сравнению со стандартным лечением, в среднем при нейропатической форме на 90 %, и это зарегистрировано у 93,3% пациентов, при нейроишемической на 80 %, и это зарегистрировано у 83,3% пациентов.

2. Применение ДЭ у больных с СДС безопасно.

3. Ускорение заживления, по сравнению со стандартным ведением, при однократном применении ДЭ в стадию грануляции язвенного дефекта у больных с СДС длится около 1 месяца.

4. При наличии у пациентов с СДС таких исходных факторов, как низкие показатели  $TcPO_2$  – менее 35 мм рт. ст., ЛПИ < 0,45 высокая степень бактериальной обсемененности язвы  $> 10^5$  на 1 мл отделяемого, хронический отек нижних конечностей, ожирение, железодефицитная анемия применение ДЭ для ускорения заживления раневого дефекта неэффективно.

5. Повторное применение ДЭ при рецидиве трофической язвы у пациентов с СДС эффективно.

6. Применение ДЭ у больных с СДС в сроки наблюдения до 12 месяцев дает лучшие результаты по сравнению со стандартным лечением: на 14,1% больше заживших язв, на 15,3% меньше рецидивов, на 11,7% меньше ампутаций.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для ускорения заживления трофической язвы и улучшения результатов лечения СДС, особенно при нейропатической форме, в фазу грануляции целесообразно местное применение Дермального эквивалента.

2. Применение ДЭ у пациентов с СДС нецелесообразно в фазу некроза и при наличии таких исходных факторов как низкие показатели  $TcPO_2$  – менее 35 мм рт. ст., ЛПИ  $< 0,45$ , высокая степень бактериальной обсемененности  $> 10^5$  на 1мл отделяемого и сопутствующей патологии: хронического отека нижних конечностей, ожирения, железодефицитной анемии.

3. Оценивать результат терапевтического эффекта от однократного применения ДЭ в стадию грануляции язвенного дефекта при СДС целесообразно спустя 1 месяц.

4. При рецидиве трофических язв у пациентов СДС в местном лечении для лучшего заживления целесообразно повторное применение ДЭ.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АД – артериальное давление
- ВБ – варикозная болезнь
- ВКМ – внеклеточная матрица
- ГСЭФР – гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста (HBEGF – heparin-binding EGF-like growth factor)
- ДЭ – дермальный эквивалент
- ИЛ – интерлейкин
- ИРП – индивидуальная разгрузочная повязка
- ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс
- ММП – матриксные металлопротеиназы
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
- НИИ – научно-исследовательский институт
- ОИМ – острый инфаркт миокарда
- ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
- ПЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
- РАН – российская академия наук
- СД – сахарный диабет
- СДС – синдром диабетической стопы
- ТсРО<sub>2</sub> – перкутанное напряжение кислорода
- ТИМП – тканевые ингибиторы металлопротеиназ
- ТФР – трансформирующий фактор роста
- ТЯ – трофическая язва
- ФБ – фибробласты
- ФНО – фактор некроза опухоли ( tumor necrosis factor, TNF)
- ФРК – фактор роста кератиноцитов
- ФРК-ГМ – фактора роста колоний гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
- ФРСТ – фактор роста соединительной ткани
- ФРФ – фактор роста фибробластов (FGF – fibroblast growth factor)
- ХВН – хроническая венозная недостаточность
- ЭФР – эпидермальный фактор роста
- IgG – иммуноглобулина G
- VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (фактора роста эндотелия сосудов)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алексеев, А.А. Влияние трансплантации аллофибробластов на раневой процесс и его исходы у обожженных / А.А. Алексеев, Н.Н. Фисталь, Д.П. Подурец // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 1. – С. 36–39.
2. Андреев, Д.Ю. Аутодермопластика расщепленными лоскутами в лечении гангренозной пиодермии / Д.Ю. Андреев // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2011. – Т. 170, № 1. – С. 72–75.
3. Андреев, Д.Ю. Эффективность кожной пластики и дермального эквивалента в лечении обширных язв голени смешанного генеза / Д.Ю. Андреев [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2013. – Т. 172, № 1. – С. 104–107.
4. Анциферов, М.Б. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение и профилактика / М.Б. Анциферов, Е.Ю. Комелягина. – М.: Медицинское информационное агенство. – 2013. – 304 с.
5. Батиков, В.Д. Организация и проведение микробиологических исследований в очагах массовых санитарных потерь: учеб.пособие / В.Д. Батиков, В.Н. Печенеев; Воен.-мед. акад. – СПб:ВМА. – 1997. – 28с.
6. Белозерцева, Ю.П. Синдром диабетической стопы: этиология, патогенез, классификации и лечение / Ю.П. Белозерцева, П.П. Курлаев, В.А.Гриценко // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2016. – № 1. – С. 69–78.
7. Бенсман, В.М. Хирургия гнойно-некротических осложнений диабетической стопы.: руководство для врачей / В. М. Бенсман – М.: Медпрактика-М.. – 2015. – 496 с.
8. Брискин, Б.С. Применение биопластического материала коллост для лечения раневых дефектов у пациентов с осложненными формами синдрома диабетической стопы.: учебное пособие для врачей. / Б.С. Брискин. – М.: Медицина. – 2014. – 110 с.
9. Вёрткин, А.Л. Сахарный диабет: руководство для практических врачей. / А.Л. Вёрткин. –М.: Изд-во «Эксмо», 2015. – 160 с.
10. Влияние терапии отрицательным давлением на репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы / Е.Л. Зайцева [и др.] // Сахарный диабет. – 2014. – № 3. – С. 113–121.
11. Влияние проводниковой анестезии на кровоток и транскутарное напряжение кислорода у больных с синдромом «диабетическая стопа» / А.А. Казанин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 278.

12. Гавриленко, А.В. Генные технологии стимуляции ангиогенеза как инновационное направление в ангиологии и сосудистой хирургии / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 7–14.
13. Гавриленко, А.В. Использование фибробластов и кератиноцитов в комплексном лечении венозных трофических язв / А.В. Гавриленко, О.В. Павлова, П.Е. Вахрастьян // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2008. – № 10. – С. 80–83.
14. Гейниц, А.В. Новые технологии внутривенного лазерного облучения крови: «ВЛОК+УФОК» и «ВЛОК-405 / А.В. Гейниц, С.В. Москвин. – М.: Триада, 2010. – 96 с.
15. Глухов, А.А. Патофизиология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса / А.А. Глухов, М.В. Аралова // Новости хирургии. – 2015. – Т. 23, № 6. – С. 673–679.
16. Гнойно-некротические поражения стопы, критическая ишемия нижних конечностей и сахарный диабет. Хирургическое лечение / В.А. Митиш [и др.] // Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. – 2012. – № 1. – С. 35–39.
17. Гурьева, И.В. Профилактика и лечение заболеваний стопы при диабете. Руководство, документы и рекомендации. Международный консенсус по диабетической стопе 2015. / И.В. Гурьева – М, 2016. – 168 с.
18. Дедов, И.И. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинко-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 13–41.
19. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи / В.Л. Зорин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – № 4. – С. 26–40.
20. Дermalный эквивалент на основе фибрина и восстановление соединительной ткани в результате его трансплантации на раны экспериментальных животных. / Н.М. Юдинцева [и др.] // Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения – М., 2009. – С. 209–221.
21. Дифференцированный подход к выбору кожной пластики операций у больных с хирургической инфекцией / В.К. Гостищев [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2009. – № 12. – С. 19–24.
22. Драгунов, А.Г. Применение внутритканевого введения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами (АОТ), при лечении ишемии нижних конечностей / А.Г. Драгунов, Ю.В. Александров, С.А. Хрипунов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14, № 4. – С. 17–19.
23. Ефимов, Е.В. Особенности течения раневого процесса на фоне сахарного диабета / Е.В. Ефимов, А.В. Хорошкевич // Раны и раневые инфекции. – 2015. – Т. 2, № 3. – С. 30–35.

24. Завацкий, В.В. Местное лечение обширной диабетической раны стопы при помощи отрицательного давления (клиническое наблюдение) / В.В. Завацкий // Тольяттинский медицинский консилиум. – 2015. – № 3-4. – С. 85–91.
25. Зорин, В.Л. Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины / В.Л. Зорин, А.И. Зорина, В.Р. Черкасов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – № 3. – С. 68–78.
26. Ивануса, С.Я. Современные представления о методиках оценки течения раневого процесса у больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы / С.Я. Ивануса, Б.В. Рисман, Г.Г. Иванов // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – Т. 54, № 2. – С. 190–194.
27. Игнатович, И.Н. Хирургия и ангиология диабетической стопы: монография. / И.Н. Игнатович, Г.Г. Кондратенко. – Минск: БГМУ, 2013. – 304 с.
28. Использование клеточных технологий для восстановления повреждений кожи при ожоговой травме / Д.Я. Алейник [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 331.
29. Использование клеточных культур при местном лечении ожоговых ран / Е.В. Глущенко [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 1993. – № 11. – С. 26–29.
30. Использование культивированных фибробластов для восстановления кожного покрова у тяжелообожженных / Д.С. Саркисов [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – Т. 19, № 6. – С. 566–570.
31. К вопросу о выборе раневых покрытий в лечении гнойных ран / Ю.С. Винник [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-5. – С. 1061–1064.
32. Кисляков, В.А. Синдром диабетической стопы: комплексный подход к лечению / В.А. Кисляков, В.Н. Оболенский, И.А. Юсупов // РМЖ. – 2016. – Т. 24, № 12. – С. 768–770.
33. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран / Ю.С. Винник [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Том IV, № 2. – С. 392–397.
34. Клинико-экономический анализ применения препарата эпидермального фактора роста (Эберпрот-П) у больных с синдромом диабетической стопы / Г.Р. Галстян [и др.] // Эндокринная хирургия. – 2013. – № 1. – С. 4–15.
35. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы / Г.Р. Галстян [и др.] // Раны и раневые инфекции. – 2015 – Т. 2, – № 3. – С. 63–83.
36. Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта «Эквивалент дермальный ЭД» / М.И. Блинова [и др.] // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2015. – Т.10., № 2. – С. 690–694.

37. Комелягина, Е.Ю. Клинико-морфологические параметры и маркеры репарации нейропатических язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы / Е.Ю. Комелягина, Е.А. Коган, М.Б. Анциферов // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, № 3. – С. 70–76.
38. Комелягина, Е.Ю. Оценка клинико-морфологических особенностей заживления язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы / Е.Ю. Комелягина, Е.А. Коган, М.Б. Анциферов // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 135–141.
39. Комплексное оперативно-медикаментозное лечение осложненных форм синдрома диабетической стопы / Д.А. Абдуллоев [и др.] // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2016. – № 1. – С. 74–76.
40. Комплексный подход в лечении больных с синдромом диабетической стопы / А.К. Хестанов [и др.] // Альманах мировой науки. – 2016. – № 4-1 (7). – С. 77–85.
41. Консервативная терапия у больных хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. Современные представления / В.М. Кошкин [и др.] // Медицинский совет. – 2015. – № 8. – С. 6–9.
42. Корейба, К.А. Лечение раневых дефектов у больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы с применением биопластического материала / К.А. Корейба, М.Н. Кудырин, А.Р. Минабутдинов // Хирургия. Журнал им. Н.И.Пирогова. – 2015. – № 7. – С. 69–74.
43. Корейба, К.А. Биопластические материалы на основе нативного коллагена I типа при лечении больных с синдромом диабетической стопы / К.А. Корейба, А.Р. Минабутдинов // Хирургия. Журнал им. Н.И.Пирогова. – 2014. – № 10. – С. 83–87.
44. Корейба, К.А. Новые технологии в лечении ран / К.А. Корейба // Современная медицина. – 2016. – № 2. – С. 109–110.
45. Корейба, К.А. Хирургические инфекционные поражения кожи и мягких тканей. Лечение длительно незаживающих ран. / К.А. Корейба, А.Р. Газиев. – Казань: ГМУ, 2011. – 254 с.
46. Королева Т.А. Оценка эффективности применения современных эквивалентов кожи в лечении детей с глубокими ожогами / Т.А. Королёва // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 3. – С. 35–42.
47. Лапин, А.Ю. Лечение трофических язв венозного генеза с применением возможностей клеточной терапии / А.Ю. Лапин, О.Н. Скрябин, М.А. Рубцов // Амбулаторная хирургия. – 2014. – № 1. – С. 5–11.
48. Лечение длительно не заживающих донорских участков: трансплантация культивированных аллофибробластов человека / В.Ю. Мороз [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И.Пирогова. – 1993. – № 7. – С. 71–75.

49. Липатов, К.В. Значение аутотрансплантации расщепленной кожи в гнойной хирургии / К.В. Липатов, Е.А. Комарова // Трансплантология. – 2012. – № 1-2. – С. 5–9.
50. Мадянов И.В. Синдром диабетической стопы. Фокус на инфицированные язвы / И.В. Мадянов // Здоровоохранение Чувашии. – 2016. – Т.49, № 4. – С. 41–45.
51. Макарова, А.Н. Использование фибробластов в комбустиологии / А.Н. Макарова, А.В. Лизунов, Т.Э. Хамидулин // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. – 2016. – Т.3, № 3. – С. 86–88.
52. Местное лечение острых и хронических ран у детей с хирургической инфекцией / А.И. Кузьмин [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12-17. – С. 1240–1241.
53. Механизмы действия вакуумной терапии ран / А.Ч. Часнойть [и др.] // Медицинские новости. – 2015. – № 7. – С. 12–16.
54. Механизмы нейрогуморальной регуляции клеточного цикла кератиноцитов при сахарном диабете / Е.В. Артёмова [и др.] // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19, № 5. – С. 366–374.
55. Минаков, О.Е. Синдром диабетической стопы / О.Е. Минаков, А.А. Андреев, А.П.Остроушко // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2017. – Т. 10, № 2. – С. 165–172.
56. Мировой опыт генотерапии ишемических заболеваний / Р.В. Деев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 17, № 2. – С. 145–154.
57. Мишинькин, П.Н. Общая хирургия: конспект лекций. / П.Н. Мишинькин, А.Ю. Неганова. – М.: «Эксмо», 2005. – 160 с.
58. Морфологическая оценка эффективности применения гидрохирургической системы VERSAJET в сочетании с комбинированной антибактериальной терапией при лечении гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы с биопленочными формами бактерий / И.А. Чекмарёва [и др.] // Раны и раневые инфекции. – 2015. – Т.2, № 3. – С. 8–21.
59. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика интенсивности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы / Е.Л. Зайцева [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 8, № 4. – С. 72–78.
60. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей. Российский согласительный документ. – М.: Ангиология ИНФО, 2013. – 68 с.
61. Новые технологии в лечении синдрома диабетической стопы на территории Республики Башкортостан / Р.Э. Абдрахманов [и др.] // Научный альманах. – 2015. – № 8. – С. 918–922.

62. Оболенский, В.Н. Современные методы лечения хронических ран / В.Н. Оболенский // Медицинский совет. – 2016. – № 10. – С. 148–154.
63. Оболенский, В.Н. Хроническая рана: обзор современных методов лечения / В.Н. Оболенский // РМЖ. – 2013. – № 5. – С. 282–289.
64. Оптимизация местного лечения раневых дефектов у пациентов с синдромом диабетической стопы А.Г. Сонис [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 2-2. – С. 47–48.
65. Опыт применения дермального эквивалента в лечении ожогов 3 степени / К.М. Крылов [и др.] // III съезд комбустиологов России: сб. тез. – М., 2010. – С. 174.
66. Павлышин, А.В. Пластическое закрытие ран и трофических язв рельефным аутотрансплантатом у больных с синдромом диабетической стопы / А.В. Павлышин, В.А. Шидловский, П.А. Герасимчук // Вестник РАМН. – 2013. – № 1. – С. 72–75.
67. Патогенетические аспекты местного лечения синдрома диабетической стопы. Новая альгинатная повязка Fibroclean Ag: какие преимущества? / Е.В. Бублик [и др.] // Раны и раневые инфекции. – 2015. – № 1. – С. 20–25.
68. Патофизиологические аспекты процесса заживления ран в норме и при синдроме диабетической стопы / Н.В. Максимова [и др.] // Вестник РАМН. – 2014. – № 11-12. – С. 110–117.
69. Перспективы использования фетальных фибробластов человека при лечении ран различной этиологии / Т.Д. Колокольцова [и др.] // Вестник РАМН. – 1998. – № 6. – С. 32–35.
70. Плешков, А.С. Применение донорской кожи для лечения ожогов / А.С. Плешков // Трансплантология. – 2016. – № 1. – С. 36–46.
71. Попов, О.С. Комбинированный хирургический метод лечения венозных трофических язв нижних конечностей / О.С. Попов, Ф.Ф. Ганиев, П.Ю. Хлопотов // Креативная хирургия и онкология. – 2011. – № 1. – С. 74–77.
72. Попова, Л.Н. Как изменяются границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении ран.: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.Н. Попова – М., 1942. – 16 с.
73. Применение вакуумной терапии в хирургии диабетической стопы / М.А. Нартайлаков [и др.] // Креативная хирургия и онкология. – 2017. – Т. 7, № 3. – С. 29–35.
74. Применение дермальных фибробластов в комплексном лечении больных трофическими язвами венозной этиологии / А.Ж. Мельцова [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2007. – Т. 166, № 1. – С. 72–77.
75. Применение дермальных фибробластов человека в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / В.В. Грищенко [и др.] // Амбулаторная хирургия. – 2005. – № 3. – С. 34–36.

76. Применение современных методов лечения гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы / М.М. Мукушев [и др.] // Медицинский журнал Западного Казахстана. – 2016. – Т. 52, № 4. – С. 34–37.
77. Процессы репаративной регенерации в гнойных ранах при местном сочетанном лечении физическими методами и биологически активными материалами / А.В. Прошин [и др.] // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. 2017. – Т. 101, № 3. – С. 61–65.
78. Прудков, М.И. Диагностика и лечение синдрома диабетической стопы. учеб пособие. / М.И. Прудков. – Екатеринбург: УГМУ, 2016 – 90 с.
79. Регенеративные технологии в лечение синдрома диабетической стопы / Р.Е. Калинин [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 15–26.
80. Роль некрэктомии в комплексном лечении пациентов с синдромом диабетической стопы / О.А. Шумков [и др.] // Медицинские и фармацевтические науки. – 2014. – № 4. – С. 51.
81. Рундо, А.И. Применение комбинированной фототерапии в комплексном лечении пациентов с осложнениями синдрома диабетической стопы / А.И. Рундо, В.А. Косинец // Новости хирургии. – 2016. – Т.24, № 2. – С. 131–137.
82. Синдром диабетической стопы в клинической практике / В.Н. Оболенский [и др.] // РМЖ. – 2010. – Т. 18, № 2. – С. 45–54.
83. Синдром диабетической стопы – рациональные подходы к диагностике и лечению / М.И. Митронин [и др.] // Практическая медицина. – 2015. – Т. 89, № 4-1. – С. 140–142.
84. Современные раневые покрытия / Г.С. Стабаева [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 10. – С. 235–239.
85. Спичкина, О.Г. Клеточные технологии в лечении трофических язв и длительно незаживающих ран / О.Г. Спичкина, Н.В. Калмыкова, С.И. Моисеев // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2012. – № 4. – С. 61–68.
86. Сравнительная характеристика волокнистого состава рубца после введения ауто- и гетерофибробластов в рану мышей / Е.Ю. Шаповалова [и др.] // Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 100–104.
87. Сравнительный анализ кожной пластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов / Н.М. Жилина [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 1997 – Т. IV, № 1. – С. 88–92.
88. Средства, содержащие поверхностно-активные вещества, в комплексном лечении гнойно-воспалительных заболеваний в условиях дневного хирургического стационара / В.Н. Строй [и др.] // Амбулаторная хирургия. – 2010. – № 1. – С. 63–65.



89. Страхова, Г.Ю. Эффективность коллагенсодержащих повязок в комплексной терапии хронических раневых дефектов у больных сахарным диабетом / Г.Ю. Страхова, М.И. Арбузова, А.Ю. Токмакова // Сахарный диабет. – 2007. – № 4. – С. 7–11.
90. Ступин, В.А. Метаболическая терапия больных синдромом диабетической стопы / В.А. Ступин, С.В. Горюнов, А.И. Привиденцев // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова –2013. – № 10. – С. 25–31.
91. Титова, С.Н. Оценка состояния микроциркуляции при комплексном лечении пациентов с синдромом диабетической стопы с применением ВЛОК и дискретного плазмафереза в амбулаторно-поликлинических условиях / С.Н. Титова, А.В. Муха // Хирургическая практика. – 2015. – № 1. – С. 27–37.
92. Тканеинженерные конструкции кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (обзор) / А.В. Мелешина [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 198–220.
93. Токмакова, А.Ю. Хронические раны и сахарный диабет: современная концепция и перспективы консервативного лечения / А.Ю. Токмакова, Л.П. Доронина, Г.Ю. Страхова // Сахарный диабет. – 2010. – № 4. – С. 63–68.
94. Туманов, В.П. Десятилетний опыт использования культивированных клеток кожи человека для лечения термических ожогов / В.П. Туманов, А.А. Алексеев, Л.И. Будкевич // Архив патологии. – 1999. – Т. 61, № 4. – С. 5–9.
95. Храмин, В.Н. Местное лечение ран. Учебное пособие для врачей и медицинских сестер. / В.Н. Храмин. – М.,: Изд-во «Проспект», 2012. – 64 с.
96. Шлепотина, Н.М. Микробиологическое и клиническое значение биопленочных инфекций (обзор литературы) / Н.М. Шлепотина, Л.Л. Плоткин, В.В. Белов // Уральский медицинский журнал. – 2014. – Т. 118, № 4. – С. 106–112.
97. Эволюция применения отрицательного давления для лечения ран / Д.В. Терсков [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 3. – С. 135.
98. Эффективность препарата для терапевтического ангиогенеза в комплексном лечении пациентов с сахарным диабетом и критической ишемией нижних конечностей / Р.Е. Калинин [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97, № 5. – С. 674–680.
99. Эффективность клеточной терапии в лечение больных с трофическими язвами нижних конечностей венозной этиологии / В.М. Седов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2007. – № 13. – С. 65–75.
100. Юркова, Р.А. Вакуум-терапия трофических язв нижних конечностей у больных с СДС / Р.А. Юркова, Э.Р. Задыханов // Интерактивная наука. – 2017. – Т. 11, № 1. – С. 40–42.

101. Ярец, Ю.И. Лабораторный прогноз риска отторжения аутодермотрансплантата / Ю.И. Ярец, И.А. Новикова // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2010. –Т. 169, № 2. – С. 34–38.
102. A new method for covering large surface area wounds with autografts / H.J. Igel [et al.] // Arch. Surg. – 1974. – Vol. 108, № 5. – P. 724–729.
103. A platelet derived growth factor delivery system for bone regeneration / J.J. Delgado [et al.] // J Mater Sci Mater Med. – 2012. – Vol. 23, № 8. – P. 1903–1912.
104. A study of the impact of leg ulcers on quality of life: financial, social, and psychologic implications / T. Phillips [et al.] // J Am Acad Dermatol. – 1994. – Vol. 31. – P. 49–53.
105. A systematic review and meta-analysis of off-loading methods for diabetic foot ulcers / T. Elraiyah [et al.] // J Vasc Surg. – 2016. – Vol. 63, № 2. – P. 59–68.
106. A Quantitative analysis of microcirculation in skin defects covered with topical wound dressings or a newly developed collagen matrix / M. Held [et al.] // Adv Skin Wound Care. – 2017. – Vol. 30, № 11. – P. 517–521.
107. Accelerated healing of diabetic wound using artificial dermis constructed with adipose stem cells and poly (L-glutamic acid) / chitosan scaffold / T. Shen [et al.] // Chin Med J (Engl). – 2013. – Vol.126, № 8. – P.1498 –1503.
108. Advances in the topical treatment of diabetic foot ulcers / N. Papanas [et al.] // Curr Diabetes Rev. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 209–218.
109. Age-related changes in the number of CD45 + cells in human dermis. / V.V.Petrov [et al.] // Adv Gerontol. – 2012. – Vol. 25, № 4. – P. 598–603.
110. Baltzis, D. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights // D. Baltzis, I. Eleftheriadou, A. Veves. Adv Ther. – 2014. – Vol. 31, № 8. – P. 817–836.
111. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections / C.J. Sanchez [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2013. – № 6. – P. 47.
112. Biofilms and inflammation in chronic wounds / G. Zhao [et al.] // Adv Wound Care (New Rochelle) . – 2013. – Vol. 2, № 7. – P. 389–399.
113. Biofilms in chronic wounds / G.A. James [et al.] // Wound Repair Regen. – 2008. – Vol. 16, № 1. – P. 37–44.
114. Biological background of dermal substitutes / V.C. van der Veen [et al.] // Burns. – 2010. – Vol. 36, № 6. – P. 305–321.
115. Bus, S.A. Lower-extremity dynamics of walking in neuropathic diabetic patients who wear a forefoot-offloading shoe / S.A. Bus, J.C. Maas, N.M. Otterman // Clin Biomech (Bristol, Avon). 2017. – Vol. 12, № 50. – P. 21–26.

116. Cavallini, M. Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients / M. Cavallini // *Wound Repair Regen.* – 2007. – Vol.15. № 1. – P. 35–38.
117. Cellular versus acellular matrix devices in treatment of diabetic foot ulcers: study protocol for a comparative efficacy randomized controlled trial / H. Lev-Tov [ et al. ] // *Trials.* – 2013. – Vol. 14, № 8. – P. 14–18.
118. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm / R.D. Wolcott [ et al.] // *J Wound Care.* – 2010. – Vol. 19, № 2. – P. 45–50, 52–53.
119. Comparison of five dermal substitutes in fullthickness skin wound healing in a porcine model / C. Philandrianos [ et al.] // *Burns.* – 2012. – Vol. 38, № 6. – P.820–829.
120. Comparison of matrigel and matriderm as a carrier for human amnion-derived mesenchymal stem cells in wound healing / A.C. Tuca [ et al.] // *Placenta.* – 2016. – Vol. 48, № 12. – P. 99–103.
121. Confirmatory data from EU study supports apligraf for the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers / J. S. Steinberg [ et al.] // *J Am Podiatr Med Assoc.* 2010. – Vol.100, № 1. – P. 73–77.
122. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. / H. Carasin [ et. al ] // *Burns.* – 2000. – Vol. 26, № 4. – P. 379–387.
123. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus / E. Tsourdi [ et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – P. 6.
124. Development of an engraftable skin equivalent based on matriderm with human keratinocytes and fibroblast / P.A. Golinski [ et al.] // *Handchir Mikrochir Plast Chir.* – 2009. – Vol.41, № 6. – P. 327–332.
125. Diabetic foot ulcers: the importance of patient comorbidity recognition and total contact casting in successful wound care / M. Jagadish [ et al.] // *Am Surg.* – 2016. – Vol.82, № 8. – P. 733–736.
126. Differences in the daily activity of patients with diabetic foot ulcers compared to controls in their free-living environments / H. Sheahan [ et al] // *Int Wound J.* – 2017. – Vol. 14, № 6. – P.1175–1182.
127. Duchini, G. A case of refractory pyoderma gangrenosum treated with a combination of Apligraf and systemic immunosuppressive agents / G.Duchini, P. Itin, A. Arnold // *Adv Skin Wound Care.* 2011. – Vol. 24, № 5. – P. 217–220.
128. Economic outcomes among Medicare patients receiving bioengineered cellular technologies for treatment of diabetic foot ulcers / J.B. Rice [ et al.] // *J Med Econ.* – 2015. – Vol. 18, № 8. – P. 586–95.

129. Edmonds, M. European and Australian apligraf diabetic foot ulcer study group. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers / M. Edmonds // *Int J Low Extrem Wounds*. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 11–18.
130. Effect of systemic insulin treatment on diabetic wound healing / N. Vatankhah [et al.] // *Wound Repair Regen*. – 2017. – Vol. 25, № 2. – P. 288–291.
131. Effect of total contact cast in non-healing diabetic foot ulcers in Lebanese patients / M. Merheb [et al.] // *Int Wound J*. – 2017. – Vol. 14, № 5. – P. 751–753.
132. Effectiveness and properties of the biological prosthesis permacol™ in pediatric surgery: A large single center experience / C. Filisetti [et al.] // *Ann Med Surg (Lond)*. – 2016. – Vol. 11, № 7. – P. 48–54.
133. Epithelialization in wound healing : a comprehensive review / I. Pastar [ et al.] // *Adv Wound Care ( New Rochelle )*. – 2014. – Vol. 3, № 7. – P. 445–464.
134. Evaluation of tissue engineering products for the management of neuropathic diabetic foot ulcers: an interim analysis / R.G. Frykberg [ et al.] // *J. Wound Care*. – 2016. –Vol. 25, № 7. – P. 18–25.
135. Evolution of a biosynthetic temporary skin substitute: a preliminary study / A. Woodroof [et al.] // *Eplasty*. – 2015. – Vol. 20, № 12. – P.30.
136. FOXO1, TGF-beta regulation and wound healing / A. Hameedaldeen [ et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2014. – Vol.15, № 9. – P. 16257–16269.
137. Frykberg, R.G. The incidence of lower-extremity amputation and bone resection in diabetic foot ulcer patients treated with a human fibroblast-derived dermal substitute / R.G. Frykberg, W.A. Marston, M. Cardinal // *Adv Skin Wound Care*. 2015. – Vol. 28, № 1. – P. 17–20.
138. George, J. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. / J. George, J. Onodera, T. Miyata // *J Biomed. Mater. Res. A*. – 2008. – Vol. 87, № 4. – P. 1103 –1111.
139. Grant, S.S. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance and the oxidative stress response / S.S. Grant, D.T. Hung // *Virulence*. – 2013. –Vol.15, № 4. – P. 273–283.
140. Harding, K. A prospective, multicentre, randomized controlled study of human fibroblastderived dermal substitute (Dermagraft) in patients with venous leg ulcers / K. Harding, M. Sumner, M. Cardinal // *Int Wound J*. – 2013. – Vol. 10, № 2. – P.132–137.
141. Hart, C.E. Dermagraft: use in the treatment of chronic wounds. / C.E. Hart, A. Loewen-Rodrigues, J. Lessem // *Advances in wound care*. – 2012. – Vol. 21, № 3. – P. 138–141.
142. High glucose concentrations induce TNF- $\alpha$  production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes / Y. Gonzalez [et al.] // *BMC Immunol*. – 2012. –Vol. 14, № 13. – P. 13–19.

143. Hodgkinson, T. In vitro and ex vivo analysis of hyaluronan supplementation of Integra® dermal template on human dermal fibroblasts and keratinocytes / T. Hodgkinson, A. Bayat // *J Appl Biomater Funct Mater.* – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 9–18.
144. Horn, M.M. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics / M.M. Horn, V.C.A. Martins, A.M.D. Plepis // *Carbohydrate Polymers.* – 2009. – Vol.77, № 2. – P. 239–243.
145. Human reticular acellular dermal matrix in the healing of chronic diabetic foot ulcerations that failed standard conservative treatment: a retrospective crossover study / C.M. Zelen [et al.] // *Wounds.* 2017. – Vol. 29, № 2. – P. 39–45.
146. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of fork head box O1 (FOXO1) / F. M. Siqueira [et al.] // *Diabetologia.* – 2010. – Vol. 53, № 2. – P. 378–388.
147. In vitro determination on the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Ps. Aeruginosa* and *S. aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide / M.M. Masadeh [et al.] // *Infect. Drug Resist.* – 2013. – Vol. 6. – P.27–32.
148. Incidence and microbiology of infectious complications with the use of artificial skin Integra® in burns / L. Bagues [ et.al ] // *Ann Chir Plast Esthet.* – 2009. – Vol. 54, № 6. – P. 533–539.
149. Increased perfuzi on and angiogenesis in a hind limb ischemia model with plasmid FGF-2 delivered by noninvasi ve electroporation / B. Ferraro [ et al.] // *Gene Therapy.* – 2010. – Vol. 17, № 6. – P. 763–769.
150. Integra® dermal regenerative template application on exposed tendon / J. Hulsen [et al.] // *Hand (N Y).* – 2014 – Vol. 9, № 4. – P. 539–542.
151. International working group on the diabetic foot (IWGDF). Prevention and management of foot problems in diabetes : a summary guidance for daily practice 2015, based on the IWGDF guidance documents / N.C. Schaper [ et al.] // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2017. – Vol. 124. № 2. – P. 84–92.
152. Jones, J.E. Skin grafting for venous leg ulcers / J.E. Jones, E.A. Nelson , A. Al-Hity // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2013; 1: CD001737.
153. Kashefsky, H. Total contact casting combined with human fibroblast-derived dermal tissue in 15 DFU patients / H.Kashefsky, W. Marston // *J Wound Care.* 2012. – Vol. 21., № 5. – P. 236–242.
154. Kolluri, R. Management of venous ulcers / R. Kolluri // *Tech Vasc Interv Radiol.* – 2014. – Vol. 17, № 2. – P. 132–138.
155. Lacci, K. M. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing / K.Lacci, A. Dardik // *Yale J Biol Med.* – 2010. – Vol. 83, № 1. – P. 1–9.

156. Langer, A. Systematic review of economic evaluations of human cell-derived wound care products for the treatment of venous leg and diabetic foot ulcers / A.Langer, W. Rogowski // *BMC Health Serv Resc.* – 2009. – Vol. 10, № 3. – P. 115.
157. Lohana, P. Integra™ in burns reconstruction: our experience and report of an unusual immunological reaction / P. Lohana, S. Hassan, S B. Watson // *Ann Burns Fire Disasters.* – 2014. – Vol. 27, № 1. – P.17–21.
158. Long-term in vivo assessment of bioengineered skin substitutes: a clinical study / G. Nicolletti [ et al.] // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2015. – Vol. 9, № 4. – P. 460–468.
159. Lullove, E.J. Use of ovine-based collagen extracellular matrix and gentian violet methylene blue antibacterial foam dressings to help improve clinical outcomes in lower extremity wounds : a retrospective cohort study / E.J. Lullove // *Wounds.* – 2017. – Vol. 29, № 4. – P.107–114.
160. MacNeil, S. Progress and opportunities for tissueengineered skin / S. MacNeil // *Nature.* – 2007. – Vol. 445, № 7130. – P. 874–880.
161. Management of defects on lower extremities with the use of matriderm and skin graft / J.Y Choi [ et. al ] // *Arch Plast Surg.* – 2014. – Vol.41, № 4. – P. 337–343.
162. Martinson, M. A comparative analysis of skin substitutes used in the management of diabetic foot ulcers / M. Martinson, N. Martinson // *J Wound Care.* – 2016. – Vol. 25, № 10. – P.8–17.
163. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments / V. Sarrazy [ et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2011, – Vol. 19, – Suppl. 1. – P. 10–15.
164. Meta-analysis on the clinical effects of allogenic acellular dermal matrix treatment for diabetic foot ulcer / C.L. Xue [ et al.] // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* – 2016. – Vol. 32, № 12. – P. 725–729.
165. New dermal substitutes / V.C. van der Veen [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 59–65.
166. Nguyen, D.Q. An objective longterm evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery / D.Q. Nguyen, T.S. Potokar, P. Price // *Burns.* – 2010. – Vol. 36, № 1. – P.23–28.
167. Nonactivated versus thrombin-activated platelets on wound healing and fibroblast-to-myofibroblast differentiation in vivo and in vitro / S. Scherer [ et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2012 Jan. – Vol. 129, № 1. – P. 46–54.
168. Odessey, R. Addendum: mufitcenter experience with cultured epidermal autograft for treatment of bums / R. Odeesey // *J Bum Care Rehab.* – 1992. – Vol. 13, № 1. – P. 174–180.
169. Off-loading strategies in diabetic foot syndrome-evaluation of different devices. / J. Gotz [et al.] // *Int Orthop.* – 2017. – Vol. 41, № 2. – P. 239–246.

170. Outcomes of critical limb ischemia in an urban, safety net hospital population with high wIfI amputation scores / R. Ward [et al.] // *Ann Vasc Surg.* – 2017. – Vol. 38, № 1. – P. 84–89.
171. Picard, F. Diabetes mellitus, a prothrombotic disease / F. Picard, J. Adjedj, O. Varenne // *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* – 2017. – Vol. 66, № 6. – P.385–392.
172. Prevention and treatment of biofilms by hybrid- and nanotechnologies / R.K.Kasimanickam [et al.] // *Int J Nanomedicine* – 2013. –Vol. 8, № 1. – P. 2809–2819.
173. Prospective, randomized, multi-institutional clinical trial of a silver alginate dressing to reduce lower extremity vascular surgery wound complications / C.K. Ozaki [ et al.] // *J Vasc Surg.* – 2015. – Vol. 61, № 2. – P. 419–427.
174. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products / A. El Ghalbzouri [ et al. ] // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 30, № 1. P. 71–78.
175. Rheinwatd, J.G. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells / J. G. Rheinwatd, H.Green // *Cell.* – 1975. – Vol. 6, № 3. – P. 331–343.
176. Ruitter, M. Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: review of molecular mechanisms / M. Ruitter // *Clin Sci (Lond).* – 2010 Jun 8. – Vol. 119, № 6. – P. 225–238.
177. Ruszczak, Z. Modern aspects of wound healing: an update / Z. Ruszczak, R.A. Schwartz // *Dermatol. Surg.* – 2000. – Vol. 26, № 3. – P. 219–229.
178. Saap, L.J. Clinical classification of bioengineered skin use and its correlation with healing of diabetic and venous ulcers / L.J. Saap, K. Donohue, V. Falanfa // *Dermatol. Surg.* – 2004. – Vol. 30, № 8. – P. 1095–1100.
179. Selective case study describing the use of apligraf on necrobiosis lipidica associated with diabetes / H.L. Penny [et al.] // *J Wound Care.* – 2014.– Vol .23, № 2. – P. 12–15.
180. Shahrokhi, S. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase / S.Shahrokni, A, Arno, M.G. Jeschke // *Wound Repair Regen.* – 2014. – Vol. 22, № 1. – P. 14 – 22.
181. Shevchenko, R.V. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction / R.V. Shevchenko, S.L. James, S. E. James // *J R Soc Interface.* – 2010. – Vol. 7, № 43. – P. 229–258.
182. Siedler, S. Allogenic keratinocytes suspended in human fibrin glue used for wound healing support in cronic leg ulcers / S. Siedler, S. Schufler-Petrovic // *Archives of dermatology.* – 2000. – Vol. 136, № 5. – P. 676–678.
183. Skin substitutes based on allogenic fibroblasts or keratinocytes for chronic wounds not responding to conventional therapy: a retrospective observational study / G. Pajardi [ et al.] // *Int Wound J.* – 2016.– Vol. 13, № 1. – P.44–52.

184. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. / A.W. Chua [ et.al ] // *Burns Trauma*. – 2016. – Vol. 4, № 1. – P. 3.
185. Skin tissue engineering — in vivo and in vitro applications / F.Groeber [ et al.] // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2011. – Vol. 63, № 4-5. – P. 352–366.
186. Stem cell therapy for critical limb ischemia: What can we learn from cell therapy for chronic wounds? / C. Jadowiec [et al.] // *Vascular*. – 2011. – Vol. 20, № 5. – P. 284–289.
187. Synthesis, characterization and antimicrobial properties of novel double layer nanocomposite electrospun fibers for wound dressing applications / A.J. Hassiba [ et al.] // *Int J Nanomedicine*. 2017. –Vol. 21, № 12. – P. 2205–2213.
188. The effectiveness of porcine dermal collagen (Permacol®) on wound healing in the rat model / M. Kalin [et al.] // *Indian J Surg*. – 2015. – Vol.77, ( Suppl 2 ) – P. 407–411.
189. The epidermal Integrin beta-1 and p75NTR positive cells proliferating and migrating during wound healing produce various growth factors, while the expression of p75NTR is decreased in patients with chronic skin ulcers / Y. Iwata [et al.] // *J. Dermatol Sci*. – 2013. – Vol. 71, № 2. – P. 122–129.
190. The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the society for vascular surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine / A. Hingorani [ et al.] // *J Vasc Surg*. – 2016. – Vol. 63, № 2. – P. 3–21.
191. The comparative effectiveness of a human fibroblast dermal substitute versus a dehydrated human amnion/chorion membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real-world setting 2017 / I. Kraus [ et al.] // *Wounds*. – 2017. – Vol. 29, № 5. – P. 125–132.
192. Total contact casting in the treatment of nonhealing plantar ulcers in anesthetic foot / S. Rai [ et al.] // *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. – 2016.– Vol. 82, № 4. – P.422–423.
193. Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes / J.M. Leigh [ et al.] // *Br J Dermatol*. – 1987. – Vol. 117, № 5. – P. 591–597.
194. Treatment of chronic diabetic lower extremity ulcers with advanced therapies: a prospective, randomised, controlled, multi-centre comparative study examining clinical efficacy and cost / C. M. [ et al.] // *Int Wound J*. 2016. – Vol. 13, № 2. – P. 272–282.
195. Using the exudates decision algorithm to evaluate wound dressings / J. Gove [et al.] // *Br J Nurs*. – 2014. – Vol. 23, № 6. – P. 26–29.
196. Vella, L. Characteristics predicting the outcome in individuals with diabetic foot ulcerations / L. Vella, C. Formosa // *J Am Podiatr Med Assoc*. – 2017. – Vol. 107, № 3. – P. 180–191.
197. Vyas, K.S. Wound healin: biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds / K.S. Vyas, H.C. Vasconez // *Healthcare (Basel)*. – 2014. – Vol. 2, № 3. – P. 356–400.



198. Warriner, R.A. Human fibroblast-derived dermal substitute: results from a treatment investigational device exemption (TIDE) study in diabetic foot ulcers / R.A. Warriner, M. Cardinal, T. Investigators // *Adv Skin Wound Care*. – 2011. – Vol. 24, № 7. – P. 306–311.

199. Werner, S. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing / S. Werner, T. Krieg, H. Smola // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127, № 5. – P. 998–1008.

200. Wound healing in the 21st century / S. Schreml [ et al.] // *J. Am. Fcfd. Dermatol.* – 2010. – Vol. 63, № 5. – P. 866–881.

201. Zhong, S.P. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction / S.P. Zhong, Y. Z. Zhang. C.T. Lim // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* – 2010. – Vol. 2, № 5. – P.510–525.