

Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика интенсивности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы

Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., Воронкова И.А., Токмакова А.Ю.

ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва

Цель. Оценить морфологические и иммуногистохимические параметры формирования грануляционной ткани у пациентов с синдромом диабетической стопы.

Материалы и методы. Проанализированы гистологические (световая микроскопия) и иммуногистохимические (CD68, остеопонтин, MMP-9, TIMP-1) показатели репаративных процессов мягких тканей нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом. Обследованы 63 пациента с синдромом диабетической стопы после хирургической обработки.

Результаты. После хирургической обработки в ранах отмечался выраженный отек, плохо организованный экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ), низкое содержание фибробластоподобных клеток и выраженная воспалительная инфильтрация, выявлено наличие молодой грануляционной ткани. По результатам иммуногистохимического (ИГХ) исследования у всех обследованных больных отмечалось умеренное количество макрофагов (иммунопозитивных с антителами к CD68) и интенсивная окраска матриксной металлопротеазы-9 (MMP-9), слабое окрашивание тканевого ингибитора металлопротеаз-1 (TIMP-1) и остеопонтина (OPN).

Заключение. Согласно полученным данным гистологического и иммуногистохимического исследований, репаративные процессы в мягких тканях нижних конечностей у обследованных лиц с сахарным диабетом замедлены.

Ключевые слова: сахарный диабет; хронические раны; репарация; иммуногистохимические маркеры; гистология

The morphological characteristic of tissue repair in patients with neuropathic and neuroischemic forms of diabetic foot syndrome

Zaytseva E.L., Doronina L.P., Molchikov R.V., Voronkova I.A., Tokmakova A.Y.

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

Aim. To evaluate the morphological and immunohistochemical features of granulation tissue formation in patients with diabetic foot syndrome.

Materials and methods. We analysed the histological (light microscopy) and immunohistochemical (CD31, CD68, osteopontin, MMP-9 and TIMP-1) features of tissue repair processes in patients with diabetes mellitus. The study involved 63 patients with diabetic foot syndrome after surgical debridement.

Results. We found severe intercellular oedema, poorly organised extracellular matrix, small amounts of fibroblast-like cells and expressed inflammatory infiltration, along with the presence of young granulation tissue. According to the results of the immunohistochemical studies, there were a moderate number of macrophages (immunopositive with antibodies to CD68), intense staining of MMP-9 and weak staining of TIMP-1 and osteopontin.

Conclusion. According to the findings of the histological and immunohistochemical studies, tissue repair processes in patients with diabetes mellitus are decelerated.

Key words: diabetes mellitus; chronic wounds; repair; immunohistochemistry; histology; repair markers

DOI: 10.14341/DM7587

Сахарный диабет (СД) является крайне важной медико-социальной проблемой. В 2014 г. Международная федерация диабета (IDF) опубликовала данные, свидетельствующие о том, что количество лиц,

страдающих СД, в мире насчитывает 382 млн человек [1].

Одним из серьезных осложнений данного заболевания является синдром диабетической стопы (СДС). Его наиболее типичным проявлением является развитие хро-

нических раневых дефектов (трофических язв) нижних конечностей, что ведет как к снижению качества жизни пациента, так и к значительным финансовым затратам на его лечение [2].

Хронические раны нижних конечностей различного генеза встречаются у 30–80% лиц с СД, что обусловлено замедлением процессов репарации на фоне нарушений углеводного обмена.

В норме заживление раны включает целый ряд последовательных биологических и молекулярных процессов, которые начинаются с миграции и пролиферации клеток в зоне повреждения и перестройки экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), а заканчиваются ремоделированием вновь образованных тканей и сосудов. Эффективная репарация невозможна без своевременного и точного клеточного ответа, заключающегося в активации кератиноцитов, фибробластов, эндотелиальных клеток, макрофагов и тромбоцитов [3], которые синтезируют различные факторы роста и цитокины, регулирующие раневой процесс и приводящие к достижению эпителизации [4].

В ходе нормального заживления рана проходит следующие фазы: коагуляции, воспаления, миграции-пролиферации (включая перестройку ЭЦМ) и ремоделирования [3].

В фазе коагуляции и воспаления в условиях гипоксии происходит агрегация тромбоцитов и высвобождение фрагментов фибриногена и других провоспалительных медиаторов, формирование фибринового сгустка и высвобождение факторов роста и цитокинов, восстановление клеток и хемотаксис, очищение раны. В данных процессах задействованы тромбоциты, нейтрофилы, макрофаги и моноциты.

Затем наступает фаза пролиферации, которая длится несколько дней. Происходит миграция кератиноцитов, взаимодействие между ММР, интегринами, цитокинами, в результате которого активизируется миграция клеток и продукция ЭЦМ, а также иницируются процессы неоангиогенеза. Основными клетками данной фазы являются кератиноциты, фибробласты и эндотелиальные клетки.

В течение следующего достаточно длительного периода (до нескольких месяцев) рана проходит фазу ремоделирования, включающую в себя формирование рубца, деградацию ЭЦМ с последующим сокращением и сопротивлением растяжению. Основными клетками данной фазы являются миофибробласты.

При острых ранах в каждую фазу биологические и клеточные процессы идут параллельно, что отсутствует при хроническом процессе.

Хронической принято считать рану, не зажившую за тот период времени, который является нормальным для дефектов кожи подобного типа и локализации. При остром раневом процессе имеется четкая хронология этапов заживления, в случае с хроническим раневым дефектом данный баланс нарушен.

Известно, что хронические раны, как диабетического, так и другого генеза (пролежни, ишемические и венозные язвы) часто «застревают» в одной или другой фазе, в связи с чем процесс заживления замедляется [6].

Считается, что при длительно текущем и плохо контролируемом СД, вследствие развития поздних микро- и макрососудистых осложнений, снижается экспрессия местных ростовых факторов [7].

В настоящее время проводятся многочисленные исследования роли цитокинов, ростовых факторов в заживлении при СД, однако единой оценки роли этих молекул в репарации до сих пор нет.

Гипергликемия приводит к нарушению иммунных реакций, что значительно повышает риск вторичного инфицирования. Гликирование белков изменяет их структуру и функцию, что играет важную роль в развитии макрососудистых осложнений СД [7].

По данным экспериментальных работ, высокая концентрация глюкозы тормозит пролиферацию человеческих фибробластов в культуре клеток, бычьих эндотелиальных клеток, первичных кератиноцитов кожи мышей [8]. Фибробласты теряют чувствительность к стимуляции факторами роста, а эндотелиальные клетки и макрофаги человека начинают вырабатывать большее количество ММР [8].

Хронические раневые дефекты при СД находятся в фазе воспаления более продолжительный период, чем при нормальном углеводном обмене, отмечена сниженная активность воспалительных клеток и замедление перестройки ЭЦМ. Вышеперечисленные нарушения способствуют трансформации раны из острой в хроническую [6].

У пациентов с СД зафиксировано снижение количества воспалительных клеток, отсутствие роста и миграции эпидермальных клеток, сужение просвета и окклюзия сосудов капиллярного типа в дне раны [10].

Замедление фагоцитарной активности лейкоцитов на фоне нарушения углеводного обмена приводит к изменению процессов миграции нейтрофилов и макрофагов в рану. Эти нарушения существенно повышают риск инфицирования раневых дефектов у лиц с СД [6].

В ходе многочисленных исследований при диабете отмечено снижение активности или замедление синтеза факторов роста [3, 4, 11], нарушение формирования сосудистой сети [3], падение активности макрофагов [11] и аккумуляции коллагена, в том числе нарушение барьерной функции эпидермиса и ухудшение качества грануляционной ткани [3].

Одним из факторов нормального заживления ран является достаточное насыщение тканей кислородом за счет формирования сосудистой сети. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) стимулирует неоангиогенез и, следовательно, повышает насыщение тканей кислородом (pO_2) [11].

В некоторых исследованиях было показано, что количество сосудов, окрашенных с помощью антител к CD31, а также определенных гистологически, было выше у лиц с СД, чьи раневые дефекты эпителизировались в более короткий срок, чем в группе с длительно незаживающими трофическими язвами нижних конечностей [11].

Важную роль в процессе заживления играют макрофаги. Это одни из ключевых участников клеточной репарации, так как они задействованы в очищении раны и выработке

большого количества цитокинов и факторов роста (VEGF, тромбоцитарный фактор роста (PDGF)), а также влияют на содержание ЭЦМ и его ремоделирование [10, 11].

В некоторых исследованиях отмечено постепенное снижение количества макрофагов на 5-е сутки после травмы у лабораторных животных с СД по сравнению с контрольной группой [12].

В процессах репарации важную роль играет и матрично-клеточный белок остеопонтин (OPN). Он регулирует адгезию и миграцию клеток, а также участвует в формировании грануляционной ткани.

Отмечено, что PDGF, вырабатываемый макрофагами, стимулирует синтез остеопонтина фибробластами [13].

Остеопонтин принимает участие в образовании коллагена, активации макрофагов и ингибировании ферментов, разрушающих ЭЦМ, таких как MMP [13]. Он играет ключевую роль во взаимодействии между остеобластами и остеокластами в костном ремоделировании [13].

Матриксные металлопротеазы также задействованы в репарационных процессах. Они участвуют как в миграции клеток, так и в синтезе факторов роста и в перестройке ЭЦМ. MMP-9 разрушает цепи коллагена 4 и 7 типов, являющиеся основными компонентами базальной мембраны. MMP-10 (стромелизин-2) «укорачивает» другие, не содержащие коллаген, составляющие матрикса [14].

В процессе заживления фибробласты и миофибробласты вырабатывают тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP), которые замедляют действие MMP и блокируют их активность [14].

Установлено, что высокий уровень MMP-9 в раневой жидкости свидетельствует о воспалении и является маркером плохого заживления ран при СД [15]. В других работах предлагают использовать соотношение MMP-9/TIMP-1 в качестве предиктора заживления ран при СДС [16].

Было показано, что соотношение MMP-9/TIMP-1 в экссудате снижалось в течение успешно проводимого лечения раневых дефектов у пациентов с СД 2 типа, в отличие от группы с плохо заживающими трофическими язвами, где данное соотношение оставалось повышенным [16].

Таким образом, процесс заживления ран при СД является крайне сложным и не до конца изученным. Понимание механизмов репарации поможет в поиске путей лечения этой группы больных и позволит значительно улучшить терапевтический прогноз в данной группе пациентов.

Цель

Оценить морфологические характеристики интенсивности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с нейропатической и нейроишемической формами СДС.

Материалы и методы

В исследование было включено 63 пациента (21 женщина и 42 мужчины) с нейропатической и нейроишемической формами (после реваскуляризации, без критической

ишемии) СДС, которым была проведена хирургическая обработка раневого дефекта.

После проведенной хирургической обработки проводился забор биопсийного материала тканей, с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованиями. В таблице 1 представлена клиническая характеристика обследованных больных.

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

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

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

Морфологические исследования проведены на базе лаборатории гистологии и иммуногистохимии с группой

Таблица 1

Клинко-лабораторная характеристика обследованных пациентов	
Показатель	N=63 пациента
Возраст, лет, Ме [25;75]	60 [51;66]
Тип СД (1/2)	11/52
Длительность течения СД, лет, Ме [25;75]	15 [10;20]
HbA _{1c} %, Ме [25;75]	8,7 [7,6;10]
ХС общ., ммоль/л, Ме [Q25;Q75]	4,3 [3,4;5,2]
ЛПВП, ммоль/л, Ме [Q25;Q75]	0,7 [0,6;1,0]
ЛПНП, ммоль/л, Ме [Q25;Q75]	2,4 [1,9;3,2]
ТГ, ммоль/л, Ме [Q25;Q75]	1,5 [1,2;2,2]
Гемоглобин, г/л, Ме [Q25;Q75]	120 [114;132]
Лейкоциты, 10 ⁹ /л, Ме [Q25;Q75]	7,6 [6,3;9,8]
Белок общ. сыворотки, г/л, Ме [Q25;Q75]	72 [69;75]
СОЭ, мм/час, Ме [Q25;Q75]	61 [39;75]
СКФ (MDRD), мл/мин/1,73м ² , Ме [Q25;Q75]	85 [65;102]
Площадь, см ² , Ме [Q25;Q75]	19,1 [15;34,2]
Глубина, см, Ме [Q25;Q75]	3,1 [2,2;4,8]
Стадии по Wagner, количество пациентов:	
II (%)	33 (52)
III (%)	30 (48)
Оксигенация мягких тканей стопы, мм рт.ст., Ме [Q25;Q75]	45 [38;51]
Диабетическая нейропатия (n):	
Нет	3
Есть	60
Диабетическая нефропатия (n):	
Нет	19
На стадии микроальбуминурии (МАУ)	24
На стадии протеинурии (ПУ)	12
Терминальная почечная недостаточность	8
Диабетическая ретинопатия (n):	
Нет	12
Непролиферативная	30
Препролиферативная	6
Пропролиферативная	15

криобанкинга ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ (зав. отделением д.м.н., проф. Абросимов А.Ю.).

Морфологический анализ биопсийного материала включал гистологический и иммуногистохимический методы исследования.

Из центральной зоны раневого ложа проводился забор биоптата объемом 0,5 см³, после чего материал фиксировали в 10% растворе формалина, а затем заливали в парафин по обычной методике.

Серийные срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали по стандартной схеме и окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистологическая оценка выраженности отека и ЭЦМ проводилась полуколичественным методом с помощью баллов, где 1 «+» — слабо выражено, 2 «+» — умеренно выражено, 3 «+» — сильно выражено, 4 «+» — очень сильно выражено.

Оценка зрелости грануляционной ткани проводилась путем определения площади некроза, количества сосудов, выраженности воспалительного инфильтрата и клеточного состава (полиморфоядерные лейкоциты, лимфоциты, макрофаги, фибробласты) и разделялась на молодую, созревающую, зрелую, где 1 — молодая грануляционная ткань: богатая клетками и тонкостенными сосудами соединительная ткань, между сосудами много недифференцированных лимфоцитоподобных клеток соединительной ткани, лейкоцитов, плазматических клеток и лаброцитов, 2 — созревающая грануляционная ткань: продолжается дифференцировка клеточных элементов, волокнистых структур, а также сосудов. Число гематогенных элементов уменьшается, а фибробластов — увеличивается. В связи с синтезом фибробластами коллагена в межклеточных пространствах образуются аргирофильные, а затем и коллагеновые волокна. По мере созревания фибробластов количество коллагеновых волокон увеличивается, они группируются в пучки; 3 — зрелая грануляционная ткань: волокнистая соединительная ткань.

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

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли на иммуностейнере Leica BOND-MAX. Характеристика использованных антител фирмы Dako в стандартных разведениях с использованием положительного контроля: применялись антитела к ТИМП-1, к ММП-9, маркеру макрофагов CD68, остеопонтину.

Оценка экспрессии цитоплазматических маркеров (ТИМП-1, ММП-9, остеопонтин) проводилась полуко-

личественным методом: 1 «+» — окрашивание единичных клеток (менее 30% клеток), 2 «+» — 30–60% клеток, 3 «+» — 60–90%, 4 «+» — более 90% клеток.

Степень экспрессии CD68 (маркер макрофагов миелоидных и гистиоцитарных клеток) была рассчитана полуколичественным методом исходя из числа иммуно-позитивных клеток и варьировала в диапазонах: 5–10%, 10–15%, 15–20%, 20–30%, 30–40% специфически окрашенных клеток. Микрофотографии выполнены с помощью камеры LeicaDSC 450 S (Leica, Германия).

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

Всеми пациентами было подписано информированное согласие.

Статистический анализ проведен с помощью программы Статистика 7.0 (StatSoft). Для описания признаков использовали медиану, 25, 75 квартили. Корреляцию проводили по Спирмену.

Результаты

Впервые выполнена комплексная оценка интенсивности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с СДС с помощью выбранных морфологических методик.

В ходе исследования у всех пациентов после проведенной хирургической обработки и до начала местной терапии проводился забор биоптатов из дна раневых дефектов с последующим проведением гистологического и иммуногистохимического исследования.

Во всех ранах отмечался выраженный межклеточный отек — медиана выраженности отека составляла 3 [3; 4], плохо организованный ЭЦМ — медиана 2 [1; 2], низкое содержание фибробластоподобных клеток и выраженная

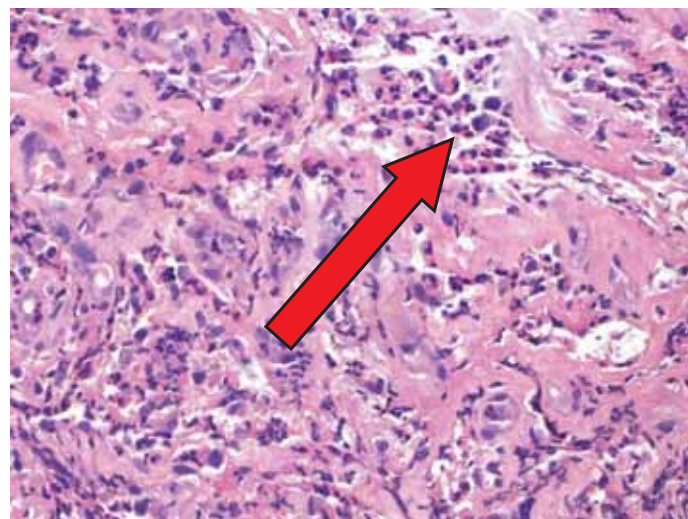


Рис. 1. Типичная гистологическая картина биоптата раневого дефекта (гематоксиллин-эозин, ×400).

Стрелкой указан воспалительный инфильтрат, поверхностный лейкоцитарно-некротический слой, состоящий преимущественно из лейкоцитов, лимфоидных элементов разной степени зрелости. Выраженный межклеточный отек. Формирующая грануляционная ткань.

воспалительная инфильтрация, выявлено наличие формирующейся молодой грануляционной ткани – 1 [1; 2].

Несмотря на то, что у многих больных раневой процесс был длительным и резистентным к местному лечению, проведенная хирургическая обработка позволила перевести хронический процесс в острый.

У большинства обследованных пациентов раны находились в фазе воспаления, медиана – 1 [1; 2].

На рис. 1 представлена типичная гистологическая картина биоптата раневого дефекта до начала местного лечения.

Иммуногистохимические особенности течения раневого процесса у лиц с синдромом диабетической стопы

По результатам ИГХ-исследования, у всех обследованных отмечались умеренное количество макрофагов (иммунопозитивных с антителами к CD68) и интенсивная

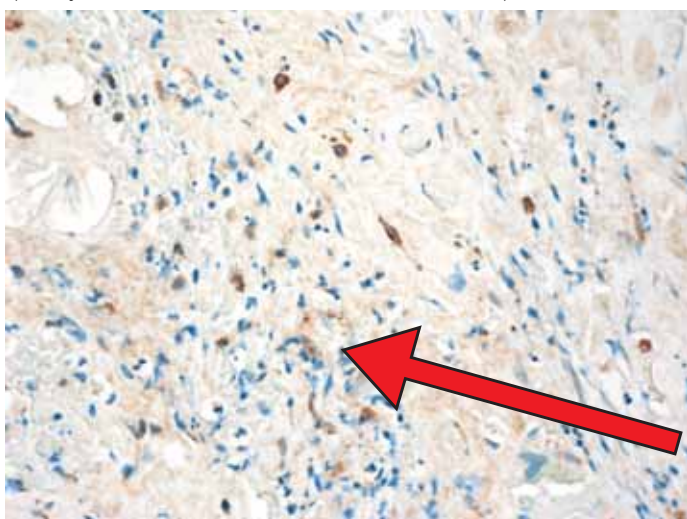


Рис. 2. Иммуногистохимическая картина биоптата раневого дефекта. Окрашивание макрофагов с помощью антител к CD68 (x200). Стрелкой указано умеренное количество окрашенных макрофагов.

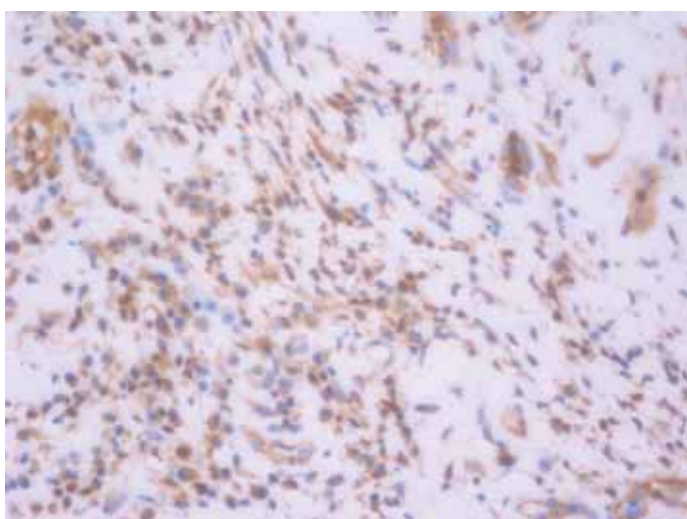


Рис. 3. Иммуногистохимическая картина биоптата раны. Окрашивание фибробластов с помощью антител к остеопонтину (x400).

окраска ММП-9, слабое окрашивание TIMP-1 и остеопонтина.

В табл. 2 представлены значения медианы [25; 75] ИГХ-маркеров репарации у обследованных больных.

Несмотря на длительный анамнез СД у обследованных больных, корреляций между длительностью заболевания, значениями гликированного гемоглобина и выраженностью репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей получено не было, $R_s = -0,01$.

На рис. 2, 3, 4, 5 представлены результаты ИГХ-исследования биоптатов ран после проведенной хирургической обработки.

Обсуждение

Хронические раневые дефекты нижних конечностей при СД в настоящий момент встречаются все чаще,

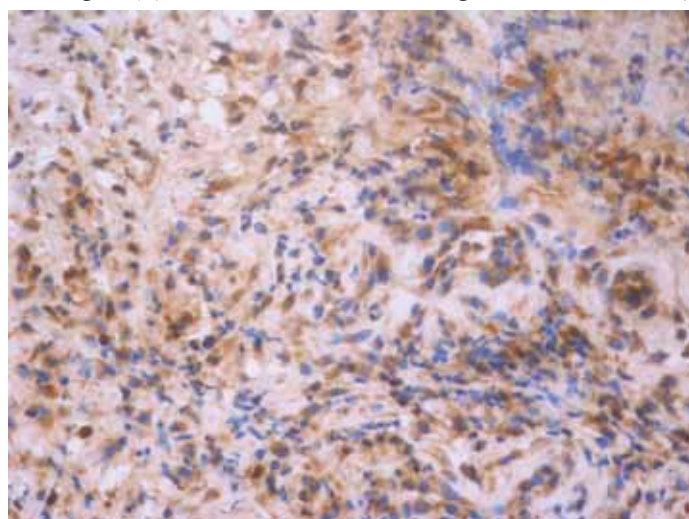


Рис. 4. Иммуногистохимическая картина окрашивания ЭЦМ с помощью антител к ММП-9 (x400). Выраженная экспрессия свидетельствует о повышенной протеолитической активности.

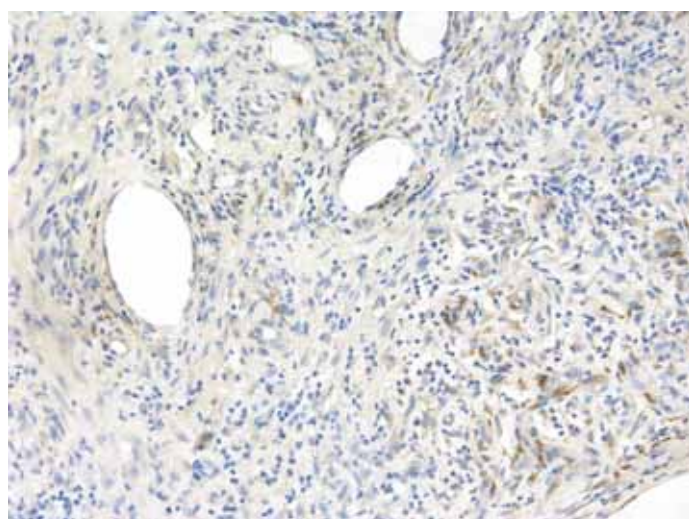


Рис. 5. Иммуногистохимическая картина биоптата раны. Слабое окрашивание ЭЦМ с помощью антител к TIMP-1 (x400).

Таблица 2

Значения маркеров репарации у обследованных больных по данным иммуногистохимического исследования	
Маркер репарации	Значения
Количество макрофагов при окрашивании AT к CD 68, Me [Q25; Q75]	10 [10; 20]
OPN, медиана экспрессии Me [Q25; Q75]	3 [2; 3]
Экспрессия MMP-9, Me [Q25; Q75]	3 [3; 4]
Экспрессия TIMP-1, Me [Q25; Q75]	1 [1; 3]

что обусловлено, в том числе, и растущей заболеваемостью СД.

Хорошо известно, что процессы заживления при нарушенном углеводном обмене замедлены, однако патофизиологические основы данного факта до конца не ясны.

Цель данного исследования заключалась в оценке морфологических и ИГХ показателей репарации у больных СД.

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

Всем пациентам была проведена хирургическая обработка раневого дефекта, адекватная антибактериальная терапия и разгрузка пораженной конечности.

В период стационарного лечения всем пациентам проводилась коррекция сахароснижающей терапии с достижением индивидуальных целевых значений гликемии [17].

В ходе клинико-лабораторного обследования выяснено, что медиана уровня гликированного гемоглобина у всех больных составляла 8,7% [7,6; 10], таким образом, состояние углеводного обмена было неудовлетворительным.

В исследовании Christman et al. было установлено, что скорость заживления ран нижних конечностей при диабете напрямую зависела от уровня гликированного гемоглобина. При значениях $HbA_{1c} \leq 7\%$ скорость заживления составляла 0,197 см² в день, при $HbA_{1c} 7-8\%$ раневые дефекты уменьшались в размерах со скоростью 0,157 см² в день, а при $HbA_{1c} \geq 8\%$ заживление происходило со скоростью 0,028 см² в день [18].

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

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

В ходе гистологического исследования биоптатов раневых дефектов до начала местного лечения было установлено, что у всех больных отмечался выраженный отек, плохо организованный экстрацеллюлярный матрикс, низкое содержание фибробластоподобных клеток и зна-

чительный воспалительный инфильтрат. Все раны находились в фазе воспаления.

Полученные данные согласуются с данными Boulton A и соавт., где было доказано, что раны при диабете имеют более продолжительную фазу воспаления, сниженную активность воспалительных клеток и замедленную перестройку ЭЦМ. Именно эти нарушения препятствуют заживлению и способствуют переходу раны из острой в хроническую [6].

Согласно работам Baltzis D и соавт., взаимодействие гликированного коллагена с ЭЦМ и фибробластами или эндотелиальными клетками препятствует адгезии клеток, их пролиферации и сокращению раны [8].

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

В ходе настоящего исследования установлено, что уровень экспрессии остеопонтина был снижен у большинства больных. Это согласуется с данными литературы, где говорится о снижении экспрессии остеопонтина у лиц с нарушениями углеводного обмена [13].

Высказывается предположение, что одной из причин замедления репаративных процессов при СД является снижение экспрессии остеопонтина в раневом ложе, что выражается в нарушении миграции иммунокомпетентных клеток, накоплении продуктов распада, уменьшении количества эндотелиальных клеток, замедлении неопангиогенеза и дезорганизации ЭЦМ [13].

У всех больных отмечается окрашивание средней интенсивности маркера макрофагов CD68.

На лабораторных моделях было доказано, что при СД количество макрофагов в ране накапливается более длительно, что может быть связано с повышением уровня провоспалительных цитокинов и протеаз и сниженным количеством факторов роста. Аналогичные данные получены и у пациентов с СД [8].

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

Так, Liu Y и соавт. отметили, что высокий уровень MMP-9 в раневой жидкости свидетельствует о воспалении и является маркером плохого заживления ран при СД [15]. Другие исследователи в своей работе предложили использовать соотношение MMP-9/TIMP-1 в качестве предиктора заживления ран при СДС [16].

Несмотря на отсутствие группы контроля в данном исследовании, полученные результаты согласуются с литературными данными.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что у лиц с СД репаративные процессы в мягких тканях замедлены, однако в настоящий момент данных об отдаленных результатах проведенного лечения недостаточно, что требует продолжения исследований.

Выводы

1. Согласно гистологическому исследованию, у лиц с СДС определялись выраженный межклеточный отек, дезорганизованный ЭЦМ, фаза воспаления и формирующаяся грануляционная ткань.
2. У обследованных лиц с хроническими ранами нижних конечностей и СД была повышена протеолитическая активность грануляционной ткани, что выражалось в повышенной экспрессии MMP-9 и сниженной экспрессии TIMP-1 по данным ИГХ-метода исследования.
3. Отмечено наличие умеренного количества макрофагов (при окрашивании АТ к CD68) и умеренной экспрессии остеопонтина, что свидетельствует о пребывании раны на начальных фазах заживления и подтверждается гистологически.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование проведено при спонсорской поддержке ФГБУ ЭНЦ в рамках утвержденной темы научно-исследовательской работы.

Авторы заявляют об отсутствии явного и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация о вкладе каждого автора: Зайцева Е.Л. — сбор и обработка материала, анализ полученных данных и написание текста; Доронина Л.П. — сбор материала; Молчков Р.В. — проведение гистологического исследования; Воронкова И.А. — проведение иммуногистохимического исследования; Токмакова А.Ю. — концепция и дизайн исследования.

Список литературы

1. IDF Diabetes Atlas. 6-th edition. 2014. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>
2. IWGDF Guidance on the diabetic foot 2015. International Working Group on the Diabetic Foot, Netherlands; 2015.
3. Зайцева Е.Л., Токмакова А.Ю. Роль факторов роста и цитокинов в репаративных процессах в мягких тканях у больных сахарным диабетом. // Сахарный диабет. — 2014. — Т. 17. — №1 — С. 57-62. [Zaytseva EL, Tokmakova AY. Effects of growth factors and cytokines on soft tissue regeneration in patients with diabetes mellitus. *Diabetes mellitus*. 2014;17(1):57-62. (In Russ).] doi: 10.14341/DM2014157-62
4. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2006;14(5):558-565. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x.
5. Materials of the 11th Annual Meeting of the European Tissue repair society. Cardiff, Wales, United Kingdom; 1996.
6. Boulton A, Cavanagh P, Raymann G. *The foot in diabetes*, 4th edition. John Wiley & Sons, 2006; p.214-221.
7. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. — М.: Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011. [Dedov II, Shestakova MV. *Diabetes mellitus: acute and chronic complications*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentsvo; 2011. (In Russ).]
8. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Advances in therapy*. 2014;31(8):817-836. doi: 10.1007/s12325-014-0140-x.
9. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *The Journal of pathology*. 2000;191(4):434-442. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<AID-PATH654>3.0.CO;2-S.
10. Ferguson MW, Herrick SE, Spencer MJ, et al. The histology of diabetic foot ulcers. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*. 1996;13 Suppl 1:S30-33.
11. Moulin V. Growth factors in skin wound healing. *European journal of cell biology*. 1995;68(1):1-7.
12. Tang Y, Zhang MJ, Hellmann J, et al. Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds. *Diabetes*. 2013;62(2):618-627. doi: 10.2337/db12-0684.
13. Mori R, Shaw TJ, Martin P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med*. 2008;205(1):43-51. doi: 10.1084/jem.20071412.
14. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, et al. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *British Journal of Cancer*. 1999;80(5-6):733-743. doi: 10.1038/sj.bjc.6690417.
15. Liu Y, Min D, Bolton T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes care*. 2009;32(1):117-119. doi: 10.2337/dc08-0763.
16. Muller M, Trocme C, Lardy B, et al. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic Medicine*. 2008;25(4):419-426. doi: 10.1111/j.1464-5491.2008.02414.x.
17. Дедов И.И., Шестакова М.В., Галстян Г.Р., и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. // Сахарный диабет. — 2015. — Т. 18. — N1(спецвыпуск). — С. 1-112. [Dedov II, Shestakova MV, Galstyan GR, Grigoryan OR, Esayan RM, Kalashnikov VY, et al. Standards of specialized diabetes care. Edited by Dedov I.I., Shestakova M.V. (7th edition). *Diabetes mellitus*. 2015;18(1S):1-112. (In Russ).] doi: 10.14341/DM20151S1-112
18. Christman AL, Selvin E, Margolis DJ, et al. Hemoglobin A1c predicts healing rate in diabetic wounds. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(10):2121-2127. doi: 10.1038/jid.2011.176.
19. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352(9131):837-853.
20. Adler AI, Erqou S, Lima TAS, Robinson AHN. Association between glycated haemoglobin and the risk of lower extremity amputation in patients with diabetes mellitus—review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2010;53(5):840-849. doi: 10.1007/s00125-009-1638-7.

Зайцева Екатерина Леонидовна

клинический аспирант отделения диабетической стопы ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

E-mail: Zai.kate@gmail.com

Доронина Людмила Петровна

к.м.н., хирург отделения диабетической стопы ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Молчков Роман Викторович

врач-патоморфолог лаборатории гистологии и иммуногистохимии с группой криобанкинга ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Воронкова Ия Александровна

к.м.н., врач-патоморфолог лаборатории гистологии и иммуногистохимии с группой криобанкинга ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Токмакова Алла Юрьевна

д.м.н., главный научный сотрудник отделения диабетической стопы ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация