НОВЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В КЛИНИКЕ

NEW PATHOGENETIC APPROACHES IN THE CLINIC

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

Б. В. Рисман¹, П. Н. Зубарев¹

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

MODERN METHODS FOR EVALUATING THE PROCESS OF THE WOUND PROCESS

B. V. Risman¹, P. N. Zubarev¹

¹ S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, Saint Petersburg, Russia

Резюме. В статье приведены данные комплексной оценки течения раневого процесса с использованием современных методов. Доказана эффективность дополнительных физических методов санации в местном лечении.

Установлено, что предложенный диагностический алгоритм позволил выявить особенности раневого процесса, а также особенности и закономерности патоморфологических изменений. Предложенный клинико-диагностический алгоритм может быть использован для оценки эффективности различных средств местного лечения раны, в том числе и физических методов воздействия на раневую процесс (2 рис., библи.: 11 ист.).

Ключевые слова: газовая хромато-масс-спектрометрия, диагностический алгоритм, микрофлора раны, общая хирургия, раневая процесс, транскутанное напряжение.

Статья поступила в редакцию 30.09.2020 г.

Summary. The article presents the data of a comprehensive assessment of the course of the wound process using modern methods. The effectiveness of additional physical methods of sanitation in local treatment has been proved.

It was found that the proposed diagnostic algorithm made it possible to identify the features of the wound process, as well as the features and patterns of pathomorphological changes. The proposed clinical diagnostic algorithm can be used to assess the effectiveness of various means of local wound treatment, including physical methods of influencing the wound process (2 figs, bibliography: 11 refs).

Key words: diagnostic algorithm, gas chromatography-mass spectrometry, general surgery, transcutaneous tension, wound microflora, wound process.

Article received 30.09.2020.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Улучшить результаты лечения больных путем изучения характеристики и предложенного диагностического алгоритма раневого процесса.

Больные с хирургической инфекцией составляют 35–45% больных хирургического профиля. Риск генерализации инфекции существует при любом, даже небольшом по размерам очаге. Развитие и прогрессирование инфекционного процесса в послеоперационном периоде способны не только свести к нулю результат выполненной операции, но и привести к летальному исходу. Летальность при развитии инфекционных осложнений в послеоперационном периоде достигает 25%. [1]. Лечение хирургических инфекционных заболеваний и послеоперационных инфекционных осложнений требует значительных трудовых и материальных затрат. Все это определяет актуальность проблемы хирургических инфекций, необходимость дальнейшего изучения их этиологии, патогенеза, разработки новых методов диагностики и лечения. Несмотря на успехи современной медицины в этом направлении, появление новых высокотехнологичных методов диагностики, высокоэффективных лекарственных препаратов, постоянное совершенствование опе-

ративной техники, с каждым годом наблюдается увеличение количества пациентов с раневой инфекцией [2].

Классическим вариантом заживления острой раны является сложный, динамический процесс, который состоит из трех фаз: воспаление, регенерация или созревание грануляционной ткани, реорганизация рубца и эпителизация [3, 4].

Фаза воспаления является первым этапом на пути к заживлению раны. Под действием тромбоцитарного звена гемостаза и плазменных факторов свертывания в ране останавливается кровотечение, тем самым начинается процесс заживления раны [5]. Фаза воспаления начинается с активации системы комплемента, который приводит к инфильтрации раны гранулоцитами и полиморфноядерными лейкоцитами (ПЯЛ). В течение 24–48 ч после травмы эти клетки мигрируют в область раны благодаря действию таких агентов, как формил-метионил пептидные продукты бактерий, тромбоциты, белок системы комплемента C5a, трансформирующий фактор роста β (ТФР β). Затем ПЯЛ путем диапедеза из крови проникают в ткани, которые окружают рану, и там активно фагоцитируют продукты распада тканей и бактерии, разрушая их лизосомными фер-

ментами, пероксидом и его радикалами. За непродолжительный период жизни ПЯЛ осуществляется их основная функция, которая заключается в предотвращении инфицирования тканей раны.

На поздних стадиях фазы воспаления (48–72 ч) число ПЯЛ уменьшается, моноциты мигрируют в область раны. Они приобретают макрофагальный фенотип, продвигаются в направлении увеличения концентрации различных хемоаттрактантов: продукты распада коллагена и эластина, фрагменты иммуноглобулина G (IgG), белки систем комплемента и свертывания, цитокины, такие как ТФР β , тромбоцитарный фактор IV, лейкотриен B₄.

Макрофаги являются наиболее важными клетками фазы воспаления. Они осуществляют бактерицидную функцию и способны секретировать факторы роста и цитокины, которые являются необходимыми для фазы пролиферации [4, 6]. Помимо этого, 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 замедлению пролиферации фибробластов, нарушенному ангиогенезу и фиброзу. Дополнительные факторы роста, такие как фактор роста фибробластов-2 (ФРФ-2), ТФР α и гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста, которые секретируются макрофагами и ПЯЛ, дополнительно ускоряют реакцию воспаления.

Через 72 ч на месте повреждения появится последний тип клеток фазы воспаления — лимфоциты, которые привлекаются интерлейкином 1 (ИЛ 1) и IgG. Предполагается, что лимфоцит вовлечен в ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ) и коллагена. Это означает, что ИЛ 1 играет важнейшую роль в регуляции коллагеназы. Считается, что лимфоциты в хроническом воспалении играют значительную роль, однако их функция в заживлении ран до сих пор полностью не ясна [4].

В конце фазы воспаления отмечается очищение раны от имеющихся продуктов распада и происходит плавный переход в фазу пролиферации. Эта фаза при заживлении раны первичным натяжением является более короткой и составляет 2–3 сут, но она может продолжаться более длительное время при нагноении раны и ее заживлении вторичным натяжением [5].

В фазу регенерации улучшаются трофика тканей и процессы микроциркуляции, новые капилляры прорастают во вновь образованные ткани, уменьшается отек тканей [7].

Через 3-е сут после возникновения раны начинается фаза пролиферации, которая протекает 2 нед и во время которой предварительная фибрин/фибронектиновая матрица замещается на грануляционную ткань. На 2–4-е сут в ране появляются миофибробласты и фибробласты, которые начинают

продуцировать ВКМ, который состоит из фибринозных 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, оказывающих паракринный и аутокринный эффекты [4, 8].

Аутокринный эффект фибробластов обеспечивается за счет секреции ряда факторов, в том числе фактора роста соединительной ткани (ФРСТ), синтез которого стимулирует ТФР β , который активизирует хемотаксис фибробластов. ФРСТ обеспечивает стимулирующее действие на пролиферацию фибробластов и синтез коллагена.

Обеспечение паракринного эффекта осуществляется секрецией фибробластами эпидермального фактора роста (ЭФР), фактора роста кератиноцитов (ФРК), фактора роста колоний гранулоцитов-макрофагов, ФРФ 10, ИЛ 6. Фибробласты выделяют цитокины, стимулирующие кератиноциты к синтезу составных частей базальной мембраны: коллагена IV и VII типов, перликана, ламинина-5. Взаимодействие между ВКМ и фибробластами определяет синтез и ремоделирование ВКМ.

Новые кровеносные сосуды формируются на протяжении всех этапов процесса заживления. Во время фазы гемостаза ТФР и ТФР β , которые секретируются тромбоцитами, привлекают гранулоциты, макрофаги и стимулируют ангиогенез. Макрофаги играют одну из главных ролей в ангиогенезе, синтезируя ФРФ-2 и фактор некроза опухоли α . В фибрин/фибронектин раневой сгусток внедряются капиллярные ростки и за несколько дней формируют в грануляционной ткани распространенную микрососудистую сеть. По мере того как коллаген образуется в грануляционной ткани, уменьшается количество кровеносных сосудов. Соотношение составных частей в этом динамическом процессе приводит к замедлению заживления ран.

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

Кератиноциты осуществляют процесс эпителизации и управляют неоангиогенезом, экспрессируя фактор роста эндотелия сосудов [4, 6]. За счет развитой сети капилляров фибробласты обеспечиваются питанием и кислородом, тем самым стимулируется рост клеток и поддерживается синтез матрицы раны. Постепенно уменьшаются отек и экссудация, грануляционная ткань заполняет весь раневой дефект [4].

Отдельные слои кератиноцитов начинают перемещаться с краев раны уже в течение несколько

часов после повреждения. Примерно через 12 ч после ранения под воздействием таких факторов роста, как ЭФР, основной ФРК, ФРФ, наблюдается увеличение митотической активности в базальных клетках краев раны и вокруг придатков кожи. Процесс пролиферации кератиноцитов заканчивается путем контактного торможения, после которого происходит синтез базальной мембраны. Если нет повреждения базальной мембраны, сохранена влажная среда раны и ее хирургическая обработка не требуется, то скорость покрытия эпидермисом увеличивается. Восстановление многослойного эпидермиса происходит за счет дальнейшего роста и дифференцировки эпителиальных клеток [4].

В фазе реорганизации рубца и эпителизации при первичном натяжении или под струпом происходит эпителизация раны путем миграции эпителия с краев раны. Если рана заживает вторичным натяжением, происходит формирование грубого соединительнотканного рубца [5].

Эта стадия процесса заживления наиболее продолжительна и начинается с формирования грануляционной ткани. В процессе развития матрикса количество фибронектина и гиалуроната снижается, а пучки коллагеновых волокон возрастают по площади, способствуя повышению прочности на разрыв раны. Ремоделирование представляет собой тонкое равновесие между синтезом и разрушением тканей. Оно находится под контролем протеолитических ферментов, таких как матриксные металлопротеиназы (ММП) и их природные тканевые ингибиторы. Коллагеназы и остальные ММП приводят к разрушению коллагена I и III типов, который присутствует в коже в пропорции 4 : 1.

Вначале коллаген откладывается в ране не структурировано. Затем стягивание раны осуществляется за счет взаимодействия ВКМ и фибробластов, на которое оказывает влияние ряд факторов, таких как ТФР β , ТФР и ФРФ. Организованный порядок фибрилл и прочность ткани обеспечивают стягивание раны. Со временем численность фибробластов и макрофагов уменьшается путем апоптоза, который происходит по неустановленным причинам [4, 9]. Предполагают, что апоптоз вызывается появлением 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 сосудов и клеток является финальным этапом заживления острой раны. Процесс регенерации кожи является чувствительным к различным внешним воздействиям, и зачастую в ране может быть отмечено снижение скорости заживления при длительном действии неблагоприятных местных и системных факторов. Американское общество лечения ран считает, что рана является хронической, если в течение 3 мес.

она не проходит через упорядоченный и своевременный путь, направленный на получение анатомической и функциональной целостности кожных покровов [4].

С учетом поставленных задач исследование раневого процесса у больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы проводилось по клинко-диагностическому модулю [10, 11], включавшему:

1. Методики, отражающие состояние тканей, образующих стенки и дно раны.
2. Методики, качественно и количественно характеризующие микрофлору раны.
3. Методики, определяющие состояние местной и общей резистентности и иммунитета.

Методики, отражающие состояние тканей, образующих стенки и дно раны

Всем пациентам проводилось определение транскутанного напряжения кислорода методом полярографии с использованием модифицированного электрода Кларка, устанавливаемого на кожу в самоклеящийся адаптер (фиксирующее кольцо) с контактной жидкостью производителя. Считывание, расшифровка и визуализация показаний проводились аппаратом «Radiometer Tina TCM4» (Дания).

Стандартной точкой для измерения $tcpO_2$ и $tcpCO_2$ нижних конечностей был выбран первый межплюсневый промежуток. При невозможности измерения в первом межплюсневом промежутке измерения проводили непосредственно проксимальнее области раны.

Регистрацию показателей $tcpO_2$ и $tcpCO_2$ проводили при поступлении пациента (с целью объективизации исходного состояния микроциркуляции и степени ишемии нижней конечности), при переходе во вторую фазу раневого процесса, а также при переходе в третью фазу.

У всех пациентов во время каждой смены повязки исследовали pH раневой среды (рис. 1).

Исследование производилось портативным высокоточным pH-метром «Amast» PH-012 с плоским электродом для полутвердых сред E522BNC (США) с диапазоном измерений 0,00–15,00, погрешностью 0,05 pH и шагом 0,01 pH. Калибровка прибора, хранение и подготовка к работе осуществлялись согласно инструкции производителя. Для нивелирования влияния окружающей температуры на точность измерения использовался встроенный сенсор для автоматической компенсации температуры с рабочим диапазоном от 0 до +50 °C.

Измерения осуществляли в 2–3 точках на стенке и дне раны с вычислением среднего показателя в случае отличия результатов не более 0,05 pH. При большем диапазоне показателей в пределах одной раны фиксировался каждый результат с указанием точки замера.

Рис. 1. Определение pH раневой среды

Отпечатки и соскобы с раневой поверхности проводились всем пациентам при поступлении, на 4-е, 8-е и 11-е сут. Отпечатки получали путем прикосновения предметным стеклом к раневой поверхности. Соскоб брали поскабливанием раневой поверхности деревянным шпателем или краем покровного стекла.

Мазки фиксировались путем высушивания на воздухе, окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике, азуром и эозином по Романовскому.

После окрашивания морфологическое цитологическое исследование препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа «Leica» при увеличении $\times 200$, $\times 400$ и $\times 600$. Микрофотографирование проводили цифровой фотокамерой «Lomo TCA-5» (увеличение $\times 400$). Для детерминации клеток, подсчета клеточного состава на цитологических препаратах применяли сетку Горяева, которая состоит из 225 больших квадратов (15×15). Выраженность процессов повреждения, воспаления и регенерации оценивали в баллах и вносили в таблицу: 1 балл — 0–5 клеток в поле зрения, 2 балла — 5–15 клеток, 3 балла — более 15 клеток в поле зрения.

При окраске гематоксилин-эозином оценивались ядерные изменения: реактивные, диспластические, регенераторные; цитоплазматические изменения: кератозы, дистрофические изменения.

При окраске азур-эозином по Романовскому оценивался состав воспалительного инфильтрата: нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты, плазмациты, гистиоциты, макрофаги, эозинофилы и присутствующая микрофлора.

При изучении мазков-отпечатков составлялись цитограммы и определялся их тип: некротический (полностью отсутствует фагоцитарная активность); дегенеративно-воспалительный (выявляются слабые признаки воспалительной реакции); воспалительный (характеризует нормальное течение

острого или подострого воспаления, клеточный состав — 85–90% нейтрофилов); воспалительно-регенераторный или регенераторно-воспалительный (в зависимости от превалирования того или иного компонента содержание нейтрофильных лейкоцитов снижается до 60–70%); регенераторный (содержание нейтрофилов 40–50%, преобладают молодые клетки грануляционной ткани, по краям раны обнаруживается процесс эпителизации).

Бактериологические исследования отделяемого из раны с определением чувствительности к антибиотикам проводились всем поступившим больным в соответствии с приказом Министерства здравоохранения от 22 апреля 1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Исследования проводились в центральной клинко-диагностической лаборатории ВМедА.

Забор бактериологического материала для качественного и количественного исследования микрофлоры ран осуществлялся во время операции и на 10-е сут лечения. Содержимое раны, отобранное стерильным тампоном, сеяли на чашки Петри с питательной средой (мясопептонный агар). После инкубации производили качественную оценку микроорганизмов при помощи световой микроскопии. При отсутствии роста на протяжении первых 3 сут производился пересев на среды обогащения, после чего питательные среды выдерживались еще от 3 до 5 сут. При отсутствии роста на средах обогащения делалось заключение об отсутствии микроорганизмов. Таким образом, время получения бактериологического ответа составляло в некоторых случаях до 7 сут.

Качественное определение позволяло детерминировать микроорганизмы до вида, количественное определение представлялось в колониеобразующих

единицах (КОЕ либо CFU), являющихся стандартными показателями, указывающими на число бактерий, образующих колонии в 1 мл либо в 1 г среды.

Всем пациентам выполнялся забор материала для хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров. Его производили во время операции и на 10-е сут проводимого лечения. Раневое отделяемое либо фрагмент ткани (размером не менее 0,2 × 0,2 × 0,2) помещались в стерильную пробирку Эппендорфа и в течение не более 3 ч доставлялись в лабораторию микробной хроматографии Санкт-Петербургского многопрофильного центра дисбиозов.

По стандартной методике раневое отделяемое, отобранный фрагмент ткани подвергали кислому метанолизу в течение 1 ч при 80 °С. В результате реакции метанолиза жирные кислоты, входящие в состав сложных липидов пробы, освобождаются в виде метиловых эфиров. Их двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетида в течение 15 мин при 80 °С для получения триметилсилильных эфиров гидроксикислот. Смесь эфиров в количестве 1 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы HP-5973 Hewlett Packard (США). Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора.

Площади пиков маркеров на масс-фрагментограммах интегрировали автоматически по заданной программе. Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах Excel.

Измеренные концентрации подставляли блоком в шаблон электронной таблицы Excel, в которой автоматически происходит реконструкция количественного состава микст-инфекции в виде стандартной таблицы результатов, где полученные данные сопоставлены с нормой в таблице и на графике.

Всем пациентам при поступлении и на 14-е сут выполнялась развернутая иммунография периферической крови.

Изучение количественного состава субпопуляций лимфоцитов в периферической крови выполнялось на проточном цитометре Epics XL (Coulter

Corp., USA) с использованием двойных комбинаций прямых моноклональных антител (CD3/CD19, CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/HLA-DR, CD3/CD16+56) и изотипических контролей той же фирмы. Использование изотипических контролей в ходе проведения исследования субпопуляционного состава крови требуется для повышения точности идентификации лимфоцитов. В качестве контроля использовали:

1. CD45/CD14 (для идентификации популяций лейкоцитов и выделения лимфоцитарного окна по малоугловому и боковому светорассеянию).

2. Изотипический контроль IgG1/IgG2 (для контроля неспецифического связывания лимфоцитов с антителами и выделения негативного по флюоресценции лимфоцитарного окна).

Окрашивание проб для проточно-цитометрического анализа проводили по стандартной методике: брали 100 мкл гепаринизированной крови, добавляли 10 мкл соответствующих моноклональных антител в рабочем разведении, хорошо перемешивали и инкубировали 15–20 мин при комнатной температуре. Лимфоцитарный осадок ресуспендировали и проводили измерения на проточном цитометре.

С целью объективизации скорости заживления раневого дефекта и расчета интегральных показателей применены методики цифровой фотографии и компьютерной планиметрии раны с использованием программы «Wound Analyzer» фирмы «Lohmann & Rauscher» (Австрия). Использовались цифровая камера (более 2 мегапикселей), фирменный осветительный прибор со световой температурой в диапазоне 4500–5000 К° для достижения безошибочного программного определения цветов на фотоснимке, Интернет (в настоящий момент существует лишь онлайн-версия программы) и оригинальная калибровочная линейка. Полученные фотографии загружались в онлайн-версию программы, где вручную выбирался центр калибровочного квадрата и обводилась зона раневого дефекта, после чего программа рассчитывала площадь раны и производили вычисление площади струпа, гноя, фибрина, грануляционной ткани и эпителия (рис. 2).

Площадь раны (мм ²):	3129.4
окружность (мм):	226.11
максимальная ширина (мм):	99.61
максимальная высота(мм):	46.68
Некротизированная ткань(мм ²):	431.09 (13.78%)
Струп (мм ²):	697.01 (22.27%)
Грануляционная ткань (мм ²):	989.67 (31.62%)
Эпителизированная поверхность (мм ²):	1011.63 (32.33%)

Рис. 2. Пример графического и количественного отображения результатов компьютерной планиметрии и подсчета площади раны в программе «Wound Analyzer»

Для интегральной оценки динамики размеров раны рассчитывали показатель уменьшения площади (ПУП) раневой поверхности по формуле:

$ПУП = (S_0 - S) \times 100\% / S_0$, где S_0 — исходная площадь; S — площадь раны на момент измерения. Скорость заживления (СЗ) рассчитывали по формуле: $СЗ = ПУП / T$, где ПУП — уменьшение площади раны в процентах; T — количество дней между измерениями.

Площадь ран сложной формы рассчитывалась ручным способом. Для этого их контуры переносились на пленку. С этой целью использовалась стерильная вощеная бумага, которую укладывали на рану и обводили внутренние контуры раневого дефекта, после чего полученное лекало переносили на таблицу с квадратами по 1 см² каждый и подсчитывали их по стандартной методике.

В основной группе выполнено 44 (73%) расчета ручным методом и 16 (27%) с использованием автоматизации, в контрольной 30 (71%) — ручным методом и 12 (29%) — с использованием автоматизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении мазков-отпечатков составлялись цитограммы и определялся их тип: некротический (полностью отсутствует фагоцитарная активность); дегенеративно-воспалительный (выявляются слабые признаки воспалительной реакции); воспалительный (характеризует нормальное течение острого или подострого воспаления, клеточный состав — 85–90% нейтрофилов); воспалительно-регенераторный или регенераторно-воспалительный (в зависимости от превалирования того или иного компонента, содержание нейтрофильных лейкоцитов снижается до 60–70%); регенераторный (содержание нейтрофилов 40–50%, преобладают молодые клетки грануляционной ткани, по краям раны обнаруживается процесс эпителизации). Для объективизации течения раневого процесса использовали расчет клеточного индекса по формуле:

$$\text{Клеточный индекс} = \frac{\text{макрофаги} + \text{фибробласты} + \text{полибласты}}{\text{гранулоциты} + \text{лимфоциты}}$$

В фазе воспаления показатель транскутанного напряжения кислорода ($t_{\text{срO}_2}$) в околораневой зоне в 83% случаев был ниже 24 мм рт. ст. Результаты измерения pH раневой среды выявили, что у 75,5% пациентов он превышал 7,0 единиц. Следует отметить, что у большинства больных (62,7%) отмечалась слабощелочная реакция раневой среды ($7,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$). Разнонаправленное изменение pH раневой среды зависит от особенностей метаболизма микроорганизмов, участвовавших в патологическом процессе. На 8-е сут лечения средняя величина показателя pH раневой среды у больных увеличилась до 7,7 ед. Рост средней величины показателя pH раневой среды у пациентов совпадал с началом II фазы раневого процесса.

В мазках-отпечатках с поверхности раны определялись некротические массы, фибрин, нейтрофилы в состоянии дегенерации и деструкции, а также микроорганизмы, что свидетельствовало о преобладании некротического и дегенеративно-воспалительного процессов. Отмечались единичные клетки поверхностных и глубоких слоев эпидермиса.

При изучении цитологического пейзажа в процессе завершения очищения раны смена дегенеративно-воспалительного типа цитограммы на воспалительно-регенераторный заканчивалась к 12-м сут.

Изменения цитограммы в фазе регенерации заключались в переходе воспалительно-регенераторного типа цитограммы на регенераторный к 20–23-м сут лечения. Смена типа цитограммы характеризовалась уменьшением количества нейтрофилов, увеличением количества макрофагов, появлением отдельных фибробластов.

Микробный пейзаж раны характеризовался полимикробным составом, ассоциацией аэробов и анаэробов. Смешанная аэробно-анаэробная флора выявлена у 21% больных.

По данным классического бактериологического исследования и газовой хромато-масс-спектрометрии к 8-м и 11-м сут уменьшается показатель обсемененности раны до $1,9 \pm 0,05 \times 10^4$ и $2,5 \pm 0,03 \times 10^4$ соответственно. При выполнении газовой хромато-масс-спектрометрии микробный пейзаж раневого отделяемого так же характеризовался наличием полимикробных ассоциаций. Из общего микробного числа, составившего $1,2 \times 10^5$ кл/г, наибольшие значения микробных маркеров соответствовали группе *Streptococcus* — $1,02 \times 10^4$ кл/г, *Staphylococcus* — $1,04 \times 10^4$ кл/г, *Clostridium* — $2,2 \times 10^4$ кл/г.

Все высеваемые микроорганизмы оказались чувствительны к карбапенемам и макролидам, 85% микроорганизмов — к пенициллинам, аминогликозидам, линкозаминам.

При сравнении результатов метода классической верификации возбудителя и метода определения микробных маркеров при помощи газовой хромато-масс-спектрометрии выявлена достоверная корреляция между «высеваемыми» микроорганизмами и максимальными пиками детерминированных культур. Методика хромато-масс-спектрометрии позволяет выявить группы неклостридиальных анаэробов, что в сочетании с отсутствием клинических признаков анаэробной инфекции у больных может потребовать коррекции (назначения) антибактериальной антианаэробной терапии и изменения средств для местного лечения ран.

Сроки получения результатов посевов классическим методом составляли в среднем 5 сут, в некоторых случаях (необходимость пересева на среды обогащения и дополнительная культивация) до 7–10 сут. Результат исследования раневого отделяемого при выполнении газовой хромато-

масс-спектрометрии микробных маркеров поступал в течение 4–5 ч от момента забора материала.

По результатам проведенных развернутых иммунограмм выявлено, что исходно у больных с раневым процессом наблюдался вторичный Т-клеточный иммунодефицит цитотоксического типа на фоне лейкоцитоза и дисбаланс субпопуляций Т-клеток ($CD3+CD4+/CD3+CD8+=3,81\%$, проявлявшийся ростом доли Т-хелперов ($CD3+CD4+=59,9\%$) и снижением доли цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3+CD8=15,7\%$). В то же время отмечено увеличение процента содержания Т-клеток с экспрессией маркеров натуральных киллеров CD16 и CD56 ($CD3+CD16+CD56+=12,5\%$). Нарушений субпопуляций состава В-лимфоцитов не обнаружено.

На 14-е сут лечения на фоне нормального количества лейкоцитов периферической крови отмечалась умеренная активация цитотоксических Т-клеток, что выражалось ростом процента маркеров Т-NK-клеток и активированных Т-лимфоцитов. Наблюдался дисбаланс в содержании субпопуляций Т-клеток (индекс субпопуляций Т-клеток) за счет увеличения количества цитотоксических Т-лимфоцитов. Выраженных нарушений в субпопуляции В-лимфоцитов также не выявлено.

В качестве интегрального показателя оценивали скорость заживления раневого дефекта. Применены методики цифровой фотографии и компьютерной планиметрии с использованием программы «Wound Analyzer» фирмы «Lohmann & Rauscher» (Австрия). После получения фотографии последние загружались в онлайн версию программы, в которой производился расчет площадей струпа, гноя, фибрина, грануляционной ткани и эпителия (основано на зарубежной цветовой классификации фаз раневого процесса «BYRP», разработанной JanieeZ. Cuzzell в 1988 г.). Уменьшение площади раны, выражаемое в процентах (ПУП), рассчитывали по формуле: $ПУП = (S_0 - S) \times 100\%/S_0$, где S_0 — исходная площадь; S — площадь раны на момент измерения. Скорость заживления (СЗ) рассчитывали по формуле: $СЗ = ПУП/Т$, где ПУП — уменьшение площади раны в процентах; $Т$ — количество дней между измерениями.

Из всех показателей компьютерной планиметрии ран (максимальные длина и ширина раны, площадь раны, абсолютные и относительные величины площади некроза, грануляций и эпителизации) наиболее информативными являются показатели площади некрозов и грануляций в ране, а также площадь раневого дефекта и скорость заживления раны.

По данным компьютерной планиметрии ран уменьшение площади раневого дефекта в 2 раза

происходит за $37,1 \pm 4$ дн. В период до 8 сут скорость заживления и процент уменьшения площади составляют в среднем $0,11 \pm 0,01\%/сут$ и $0,12 \pm 0,1\%/сут$ соответственно. Относительная площадь некрозов в ране уменьшилась с 1-е по 8-е сут лечения с $57,9 \pm 7,1$ до $8,9 \pm 1,3\%$, что составило в среднем $7\%/сут$. В период с 8-х по 11-е сут лечения относительная площадь некрозов ране уменьшилась с $8,9 \pm 1,3$ до $0,8 \pm 0,5\%$, что составило в среднем $2,7\%/сут$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что предложенный диагностический алгоритм позволил выявить особенности раневого процесса, а также особенности и закономерности патоморфологических изменений. Данный алгоритм позволяет оценить результаты лечения.

Предложенный клинко-диагностический алгоритм может быть использован для оценки эффективности различных средств местного лечения раны, в том числе и физических методов воздействия на раневую процесс.

Компьютерная планиметрия с программным обеспечением существенно дополняет результаты количественных и качественных микробиологических исследований, дает возможность рассчитывать площадь раневого дефекта, грануляционной и некротической ткани, фибрина, является интегральным показателем течения раневого процесса, а также позволяет сравнивать эффективность различных методов местного лечения.

ВЫВОДЫ

При оценке течения раневого процесса целесообразно использование диагностического алгоритма, включающего методики, отражающие состояние тканей, образующих стенки и дно раны, качественно и количественно характеризующие микрофлору раны, а также состояние общего иммунитета. Данный алгоритм позволяет быстро и с высокой достоверностью оценивать динамику заживления раны и корректировать лечение у больных с развернутой картиной раневого процесса.

Целесообразно применять срочную микробиологическую диагностику, осуществляемую методом газовой хромато-масс-спектрометрии. В качестве интегрального показателя оценки течения раневого процесса рекомендуется применять метод компьютерной планиметрии, что дает возможность рассчитывать площадь раневого дефекта, грануляционной и некротической ткани, фибрина, а также позволяет сравнивать эффективность различных методов местного лечения.

УВЕДОМЛЕНИЕ

Авторы внесли равный вклад в данную работу и сообщают об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

ACKNOWLEDGMENT

Authors contributed equally into this work and declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Eryukhin I. A., Gelfand B. R., Shlyapnikov S. A. Surgical infections: practical. leadership. 2nd ed., revised. and add. Moscow: Littera Publisher; 2006. 736. Russian (Ерюхин И. А., Гельфанд Б. Р., Шляпников С. А. Хирургические инфекции: Практич. руководство. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Литтерра; 2006. 736).
2. Ivanusa S. Ya., Risman B. V., Ivanov G. G. Modern ideas about the methods of assessing the course of the wound process in patients with purulent-necrotic complications of diabetic foot syndrome. Bull. Rus. Mil. Med. Acad. 2016; 2 (54): 190–4. Russian (Ивануса С. Я., Рисман Б. В., Иванов Г. Г. Современные представления о методиках оценки течения раневого процесса у больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы. Вестн. Рос. воен.-мед. акад. 2016; 2 (54): 190–4).
3. Kuzin M. I., Shkrob O. S., Kuzin N. M. Surgical diseases: Textbook. 3rd ed., rev. and add. Moscow: Meditsina Publisher; 2002. 784. Russian (Кузин М. И., Шкроб О. С., Кузин Н. М. Хирургические болезни: Учебник. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина; 2002. 784).
4. Maksimova N. V., Lyundup A. V., Lyubimov R. O., Mel'nichenko G. A., Nikolenko V. N. Pathophysiological aspects of the wound healing process in normal conditions and in diabetic foot syndrome. Vestnik RAMN Publisher. 2014; 11–12: 110–7. Russian (Максимова Н. В., Лյундуп А. В., Любимов Р. О., Мельниченко Г. А., Николенько В. Н. Патологические аспекты процесса заживления ран в норме и при синдроме диабетической стопы. Вестник РАМН. 2014; 11–12: 110–7).
5. Mishinkin P. N., Neganova A. Yu. General surgery: lecture notes. Moscow: Eksmo Publisher; 2005. 160. Russian (Мишинкин П. Н., Неганова А. Ю. Общая хирургия: Конспект лекций. М.: Эксмо; 2005. 160).
6. Schreml S., Szeimies R. M., Prantl L., Landthaler M., Babilas P. Wound healing in the 21st century. J. Am. Acad. Dermatol. 2010; 63 (5): 866–81.
7. Mashkova M. A., Mokhort T. V. Pathophysiological aspects of wound healing in diabetic foot syndrome. Zdravookhraneniye (Minsk). 2018; 12: 29–37. Russian (Машкова М. А., Мохорт Т. В. Патологические аспекты заживления язв при синдроме диабетической стопы. Здравоохранение (Минск). 2018; 12: 29–37).
8. Spichkina O. G., Kalmykova N. V., Moiseev S. I. Cell technologies in the treatment of trophic ulcers and long-term non-healing wounds. Mediko-biologicheskiye i sotsial'no-psikhologicheskiye problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh. 2012; 4: 61–9. Russian (Спичкина О. Г., Калмыкова Н. В., Моисеев С. И. Клеточные технологии в лечении трофических язв и длительно незаживающих ран. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2012; 4: 61–9).
9. Yudinseva N. M. Possibility of predicting wound epithelialization in rats by changes in the activity of matrix metalloproteinases in wound exudate. Tsitologiya. 2009; 51 (4): 311–4. Russian (Юдинцева Н. М. Возможность прогнозирования эпителизации ран у крыс по изменению активности матриксных металлопротеиназ в раневом экссудате. Цитология. 2009; 51 (4): 311–4).
10. Stetsenko B. G., Risman B. V., Ivanov G. G., Eliseeva N. A., Siryakov M. V. Algorithm for assessment and local treatment of purulent-necrotic complications of diabetic foot syndrome. Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice. Ser. "Natural and Technical Sciences". 2017; 12: 124–9. Russian (Стеценко Б. Г., Рисман Б. В., Иванов Г. Г., Елисеева Н. А., Сиряков М. В. Алгоритм оценки и местного лечения гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Сер. «Естественные и технические науки». 2017; 12: 124–9).
11. Zubarev P. N., Ivanusa S. Ya., Risman B. V. Modern principles of treatment of purulent wounds. (A textbook for cadets of the faculties of training doctors, students of the faculties of the leading medical staff, additional professional education and residency). Saint Petersburg: VMedA Publisher; 2017. 37. Russian (Зубарев П. Н., Ивануса С. Я., Рисман Б. В. Современные принципы лечения гнойных ран (Учебное пособие для курсантов факультетов подготовки врачей, слушателей факультетов руководящего медицинского состава, дополнительного профессионального образования и ординатуры). СПб.: ВМедА; 2017. 37).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Рисман Борис Вениаминович — докт. мед. наук, доцент кафедры общей хирургии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Зубарев Петр Николаевич — докт. мед. наук, доцент, профессор кафедры общей хирургии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Risman Boris V. — M. D., D. Sc. (Medicine), Associate Professor, at the General Surgery Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044

Zubarev Petr N. — M. D., D. Sc. (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the General Surgery Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044