Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова

Праця на правах рукопису

Бадзюх Сергій Вікторович

УДК: 617.586:616.379-008.64-089.48/.816

ДИСЕРТАЦІЯ

ХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З СИНДРОМОМ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ

22-Охорона здоров'я

222-Медицина

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Бадзюх Сергій Вікторович Автор цифрового підпису Бадзюх Сергій Вікторович Дата: 2024.03.27 21:27:21 +02'00' С.В. Бадзюх

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Петренко Олег Миколайович, доктор медичних наук, доцент закладу освіти кафедри хірургії №2 НМУ імені О.О. Богомольця

Київ-2024

АНОТАЦІЯ

Бадзюх С.В. Хірургічне лікування хворих із синдромом діабетичної стопи із застосуванням клітинних технологій. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 Охорона здоров'я), Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування та вирішення актуального завдання, яке полягає у підвищенні ефективності лікування пацієнтів із хронічними ранами нижніх кінцівок при цукровому діабеті шляхом застосування аплікацій аутологічного плазміногену (Pg) в комплексному хірургічному лікуванні.

В дослідженні включені результати обстеження та лікування 45 пацієнтів із хронічними ранами на тлі нейропатичної форми синдрому діабетичної стопи, які мали ранові дефекти площею від 3 до 30 $см^2$ віком від 48 до 81 року. Пацієнтів було розділено на дві групи – основну та контрольну. Досліджувана група включала 20 пацієнтів, яким на додаток до стандартної схеми лікування діабетичних ран застосовували місцево аплікації з аутологічним Pg на ділянку ураження протягом 20 діб. Контрольна група включала 25 пацієнтів з хронічними діабетичними ранами, яким проводилась стандартна загальноприйнята схема хірургічного лікування із застосуванням ранових покриттів, антисептиків, мазьових пов'язок.

Результати застосування аутологічного Pg досліджували та аналізували за динамікою змін активності цитокинів та проангіогенних факторів у зразках тканин хронічних ран у пацієнтів основної групи та контрольної групи . Критеріями клінічної успішності хірургічного лікування вважались:

наявність запальної реакції тканин та очищення ранової поверхні, зменшення больових відчуттів, появу грануляційної тканини та ретракція площі рани, терміни повного закриття ранової поверхні, кількість хірургічних втручань, частота виникнення інфекційно-запальних ускладнень.

На першому етапі дисертаційної роботи було проведено дослідження факторів ангіогенезу та активності протеаз у діабетичних ранах та порівняння даних показників в гострих діабетичних ранах. Було встановлено, що експресія центрального регулятора гіпоксія-асоційованих процесів фактор індукований гіпоксією 1-альфа (HIF-1α) в діабетичних ранах була підвищена у 4,4 раза порівняно з значеннями в гострих ранах. Натомість, вестерн-блот ендотеліального фактора росту судин (VEGF) зі зразків нормальної та виразкової тканин демонструють слідові кількості цього фактору росту у випадку діабетичної рани. Дані показники свідчили за різко виражену гіпоксію в тканинах ран. Разом з тим, Експресія регуляторів, що протидіють ангіогенезу та VEGF зміщує ангіогенний баланс у бік стану ішемії. Показано, що загальний вміст ангіостатину у діабетичних хронічних ранах перевищував у 2,5 рази порівняно із гострими ранами. Ці результати означають, що ангіогенна відповідь через підвищення регуляції утворення ангіостатину призводить до зниження експресії VEGF у тканинах. У цьому дослідженні було проведено порівняння активності матриксних металопротеїназ (ММР) у осіб з гострими (операційними) ранами та хронічними ранами при цукровому діабеті у хворих на цукровий діабет. Желатинова зимографія показала, що гострі рани містять слідові кількості активної ізоформи ММР-9, тоді як підвищення активності ММР-9 визначена в діабетичних виразках.

Наступним етапом було організовано дослідження, метою якого було дослідити, чи може місцеве застосування автологічного Pg, отриманого з плазми, покращити загоєння хронічних виразок стопи у пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу. Щоб з’ясувати вірогідні молекулярні механізми,

які лежать в основі впливу аплікацій Pg на загоєння ран, були виміряні рівні тканинної експресії ключових білкових маркерів основних фізіологічних моделей, тісно пов'язаних з регенерацією шкіри, таких як гіпоксія, ангіогенез і аутофагія.

В досліджуваній групі (I група), місцево наносили аутологічний Pg на рану в дозі 1,0 мг/мл стерильного забуференого фізіологічного розчину кожні 2 дні протягом 20 днів (загалом 10 аплікацій).

Щоб дослідити вірогідні молекулярні механізми плазміноген-індукованих переваг у загоєнні ран, ключові маркери гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії були кількісно визначені в біоптатах дермальних уражень до та на 18-й день дослідного лікування. Типові блотограми, що демонструють зміни рівнів HIF-1α, VEGF, ангіостатинів і LC3. Показано, що застосування Pg знижувало експресію центрального регулятора гіпоксій-асоційованих процесів HIF-1α у 6,3 раза порівняно з вихідним значенням ($P<0,01$). Отримані дані свідчать за те, що застосування Pg запобігає прогресуючій ішемії шкіри.

Лікування на основі Pg впливало на експресію регуляторів, що протидіють ангіогенезу, ангіостатину та VEGF, таким чином зміщуючи ангіогенний баланс у бік стану активації. Показано, що поліпептиди ангіостатину представлені у вигляді набору смуг 50, 45 і 38 кДа, які відповідають ізоформам K1-4,5, K1-4 і K1-3. Лікування Pg зменшувало загальний вміст ангіостатину на 18-й день у 2,5 раза порівняно з вихідним рівнем ($P<0,05$), водночас збільшуючи експресію VEGF у біоптатах рани в 1,9 раза ($P<0,05$). Ці результати означають, що Pg сприяє ангіогенній відповіді через зниження регуляції утворення ангіостатину та підвищення експресії VEGF у тканинах.

Результати кількісного аналізу білка LC3, пов'язаного з аутофагією, у дермальних біоптатах демонструють, що додавання Pg призвело до зниження співвідношення LC3-II/LC3-I на 18-й день лікування (у 8,6 разів, $P<0,05$). Цей

результат свідчить про те, що використання Pg як варіанту лікування хронічних ран при цукровому діабеті зменшує потік аутофагії, таким чином захищаючи тканини від аутофагічної загибелі клітин.

Давно відомо, що надекспресія ММР в хронічних ранах є невід'ємною ланкою патофізіології порушень загоєння. Тому логічним є пошук препаратів інгібіторів протеаз, які сприятливо впливають на рановий процес, та прискорюють епітелізацію. Нами продемонстровано, що лікування рани з використанням Pg знижувало активність ММР-9 у 3,5 раза на 18-ту добу лікування порівняно з вихідним значенням ($P<0,01$). Це означає, що ремоделювання тканини майже завершено, і висока активність ММР більше не потрібна.

Отримані результати хірургічного лікування свідчили, що аплікації аутологічного Pg призвели до повного загоєння діабетичної хронічної виразки стопи. В той же час, рани, які підлягали стандартному лікуванню не загоювались. В середньому, повне закриття ран, не оброблених Pg (контрольна група), було досягнуто протягом 120 ± 17 днів, в той час як закриття рани після місцевого застосування Pg спостерігалося на 24 ± 4 дні ($P<0,01$). Всі клінічні ознаки вказують на те, що місцеве застосування Pg індукує стадію гострого запалення через подолання фази хронічного запалення та зменшує рівень гіпоксії, тим самим прискорюючи загоєння рани. Важливо відзначити, що рани, оброблені Pg, були повністю закриті без ознак патологічного рубцювання. Застосування аплікацій Pg у пацієнтів основної групи дозволило досягти повного загоєння у 16 пацієнтів із ранами із площею до 10 $см^2$ на 20-24 добу лікування. Натомість, у 4 пацієнтів із ранами на тильній поверхні гомілки та стопи, площа яких сягала понад 30 $см^2$ головною задачею було очищення ранової поверхні та підготовка її до пластичного закриття. Після проведення аплікацій Pg ранову поверхню було підготовлено до пластичного закриття. Ранові дефекти було закрито шляхом аутодермопластики, лізису трансплянту не спостерігалося.

Наукова новизна роботи полягає у тому, що вперше було проведено дослідження експресії регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії разом з активністю ММР у біоптатах тканин діабетичних ран. Проведено порівняльний аналіз експресії даних цитокинів з їх активністю в гострих ранах за умов нормоглікемії. В даному дослідженні нами встановлено, що підвищені рівні ангіостатичних білків, факторів гіпоксії та гіперактивація желатиназ, можуть сприяти невдалому загоєнню ран у пацієнтів із діабетичними ранами як наслідок гіпоксії тканин та гіперглікемії.

На підставі отриманих результатів вперше продемонстровано позитивний лікувальний ефект застосування аплікацій автологічного Pg на поверхню діабетичних ран. Нами встановлено, що місцеве застосування Pg, отриманого з плазми крові пацієнтів, має виражений сприятливий ефект для загоєння виразки стопи у пацієнтів з цукровим діабетом. Pg прискорює швидкість загоєння ран шляхом запобігання гіпоксії тканин, зменшення потоку аутофагії, зменшення надмірної активності ММР та посилення ангіогенної відповіді в тканинах ділянки рани.

Встановлено, що активність ММР у хронічних діабетичних ранах сягає драматичних значень, в результаті чого самостійне загоєння ран стає неможливим. Застосування аплікацій автологічного Pg дозволяє модулювати дану активність, створити сприятливі умови для загоєння шляхом зменшення надмірної активності ММР, покращення кровопостачання та усунення запальних процесів. Оцінка активності ММР рекомендована для вибору правильної стратегії хірургічного втручання під час лікування виразки, оскільки високий рівень ММР може призвести до руйнування дермального трансплантата. Результати проведеного дослідження впроваджені в практику роботи хірургічних відділень.

Ключові слова: синдром діабетичної стопи, цукровий діабет, Хронічна рана, рановий процес, інгібітори протеаз, плазміноген, VEGF, LC3-II/LC3-I,

HIF-1α, ангіостатини, аутодермопластика, грануляційна тканина, запалення, епітелізація, матриксні металопротеїнази.

ABSTRACT

Badziukh S.V. Surgical Treatment of Patients with Diabetic Foot Syndrome Using Cellular Technologies. Qualifying paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 "Medicine" (22 Health Care), defended at the Bogomolets National Medical University.

The thesis presents the solution of a relevant challenge which will improve the treatment efficacy of patients with chronic diabetic wounds using autologous plasminogen (Pg) in comprehensive surgical treatment.

The study includes the data of examination and treatment of 45 patients, aged from 48 to 81 years, with chronic wounds associated with neuropathic diabetic foot syndrome, with wound defects ranging from 3 to 30 cm² in size. The sample formed two groups – a main group and a control group. The main group included 20 patients who, in addition to the standard treatment scheme for diabetic wounds, were locally administered autologous Pg on the affected area for 20 days. The control group included 25 patients with chronic diabetic wounds, who underwent the standard accepted scheme of surgical treatment with wound dressings, antiseptics, and ointment dressings.

The effect of autologous plasminogen (Pg) was studied and analyzed by the changes in cytokine activity and proangiogenic factors in tissue samples of chronic wounds in patients of the main and control group. The criteria for clinical success of surgical treatment were considered as: the presence of an inflammatory reaction in tissues and the cleansing of the wound surface, reduction in pain, the appearance of granulation tissue and retraction of the wound area, the terms for complete closure of the wound surface, the number of surgical interventions, and the occurrence of infectious-inflammatory complications.

In the first stage of the study, the angiogenesis factors and the activity of proteases in diabetic wounds were emphasized, with the comparison of these

indicators in acute diabetic wounds. The author established that the expression of the central regulator of hypoxia-associated processes, hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α), in diabetic wounds increased by 4.4 times compared to the values in acute wounds. Meanwhile, western blot analysis of the vascular endothelial growth factor (VEGF) from samples of healthy and ulcerative tissues showed trace amounts of this growth factor in diabetic wounds. These characteristics indicated a sharply pronounced hypoxia in the wound tissues. At the same time, the expression of regulators counteracting angiogenesis and VEGF shifts the angiogenic balance towards ischemia. The total content of angiostatin in diabetic chronic wounds exceeded that in acute wounds by 2.5 times. These results mean that the angiogenic response, through the increased regulation of angiostatin formation, leads to a decrease in the tissue VEGF expression. The study compares the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in individuals with acute (surgical) wounds and trophic feet ulcers in patients with diabetes. Gelatin zymography showed that acute wounds contain trace amounts of the active isoform of MMP-9, whereas an increase in MMP-9 activity characterized diabetic ulcers.

The next stage involved investigating whether local application of autologous Pg, derived from plasma, can improve the healing of chronic foot ulcers in patients with type II diabetes. To elucidate the likely molecular mechanisms underlying the effect of Pg on wound healing, the author measured the levels of tissue expression of key protein markers of major physiological models closely related to skin regeneration, such as hypoxia, angiogenesis, and autophagy.

In Group I, autologous Pg was locally applied to the wound in a dose of 1.0 mg/ml of sterile buffered saline every 2 days for 20 days (a total of 10 applications).

To reveal the likely molecular mechanisms of plasminogen-induced advantages in wound healing, key markers of hypoxia, angiogenesis, and autophagy were quantitatively determined in biopsies of dermal lesions before and

on the 18th day of experimental treatment. The study revealed typical blotograms demonstrating changes in the levels of HIF-1α, VEGF, angiostatins, and LC3. The application of Pg reduced the expression of the central regulator of hypoxia-associated processes, HIF-1α, by 6.3 times compared to the baseline value ($P<0.01$). The obtained data suggest that the application of Pg prevents the progression of skin ischemia.

The Pg therapy affected the expression of regulators counteracting angiogenesis, angiostatin, and VEGF, thereby shifting the angiogenic balance towards activation. The angiostatin polypeptides are represented as a set of bands of 50, 45, and 38 kDa, corresponding to isoforms K1-4,5, K1-4, and K1-3. Pg treatment reduced the total content of angiostatin by 2.5 times on the 18th day compared to the baseline level ($P<0.05$), while simultaneously increasing the expression of VEGF in wound biopsies by 1.9 times ($P<0.05$). These results mean that Pg promotes an angiogenic response through the reduction of angiostatin formation regulation and the increase of VEGF expression in tissues.

The quantitative analysis of the LC3 protein, associated with autophagy, in dermal biopsies, demonstrates that the increase in Pg led to a decrease in the LC3-II/LC3-I ratio on the 18th day of treatment (by 8.6 times, $P<0.05$). This result indicates that the use of Pg as a treatment option for diabetic chronic ulcers reduces the flow of autophagy, thereby protecting the tissues from autophagic cell death.

The overexpression of MMP in chronic wounds has long been considered as an integral part of the pathophysiology of impaired healing. Therefore, it is logical to search for protease inhibitor drugs that favourably affect the wound process and accelerate epithelialization. We have demonstrated that wound treatment using Pg reduced the activity of MMP-9 by 3.5 times on the 18th day of treatment compared to the baseline value ($P<0.01$). This means that tissue remodeling is nearly complete, and high MMP activity is no longer needed.

The obtained results of the surgical treatment indicated that applications of autologous Pg led to the complete healing of chronic diabetic foot ulcers. At the same time, wounds subjected to standard treatment did not heal. On average, complete closure of wounds treated without Pg (control group) was achieved within 120 ± 17 days, whereas wound closure after local application of Pg was observed on the 24 ± 4th day ($P<0.01$). All clinical signs suggest that local application of Pg induces the acute inflammation stage by overcoming the chronic inflammation phase and reducing the level of hypoxia, thereby accelerating wound healing. It is important to note that wounds treated with Pg were completely closed without signs of pathological scarring. The use of Pg applications in patients of the main group allowed achieving complete healing in 16 patients with wounds up to 10 cm^2 in area by the 20-24th day of treatment. Conversely, in 4 patients with wounds on the dorsal surface of the leg and foot, which reached more than 30 cm^2 in area, the main task was to clean the wound surface and prepare it for plastic closure. After the Pg applications, the wound surface was prepared for plastic closure. The wound defects were closed by autodermoplasty, and no transplant lysis was observed.

The scientific contribution of the study lies in the fact that for the first time, a study of the expression of hypoxia regulators, angiogenesis, and autophagy, along with the activity of MMPs in tissue biopsies of diabetic wounds, was conducted. The author held comparative analysis of the expression of these cytokines and their activity in acute wounds under conditions of normoglycemia. The study establishes that elevated levels of angiostatic proteins, hypoxia factors, and hyperactivation of gelatinases may contribute to the failure of wound healing in patients with diabetic wounds as a consequence of tissue hypoxia and hyperglycemia.

Based on the obtained results, for the first time, the author obtained a positive therapeutic effect of applying autologous Pg applications to the surface of diabetic wounds; and established that the local application of Pg, derived from the

blood plasma of patients, has a pronounced beneficial effect on the healing of foot ulcers in patients with diabetes. Pg accelerates wound healing by preventing tissue hypoxia, reducing the flow of autophagy, decreasing excessive MMP activity, and enhancing the angiogenic response in the tissues of the wound area.

The activity of MMPs in chronic diabetic wounds reaches dramatic levels, as a result of which spontaneous wound healing becomes impossible. The use of applications of autologous Pg allows for the modulation of this activity, creating favourable conditions for healing by reducing the excessive activity of MMPs, improving blood supply, and eliminating inflammatory processes. So, assessment of MMP activity is recommended for choosing the correct strategy of surgical intervention during the treatment of ulcers, as a high level of MMPs can lead to the destruction of dermal grafts. The results of the conducted research have been implemented in the practice of surgical departments.

Key words: diabetic foot syndrome, ulcer, chronical wounds wound, process, protease inhibitors, plasminogen, VEGF, MMP, LC3-II/LC3-I, HIF-1α, angiostatins, autodermoplasty, granulation tissue, inflammation, epithelialization, matrix metalloproteinases, tissue hypoxia, transplant lysis.

ЗМІС

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ…….14

ВСТУП……...16

РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ СТРАТЕГІЇ КОМПЛЕКСНОГО ПАТОГЕНЕТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ СИНДРОМУДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)…….23

1.1. Особливості патофізіології ранових процесів у пацієнтів із синдромом діабетичної стопи……...……23
1.2. Актуальні стратегії для всебічного патогенетичного лікування синдрому діабетичної стопи…….…33
1.3. Роль системи плазміноген/плазмін у процесах загоєння ран……37

РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ……..44

1.1. Методичний підхід……44
1.2. Загальна характеристика хворих…….48
1.3. Характеристика методів обстеження……52

РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ БАЛАНСУ ОСНОВНИХ РЕГУЛЯТОРІВ АНГІОГЕНЕЗУ ТА АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ -2,-9 У ХРОНІЧНИХ ВИРАЗКАХ ПАЦІЄНТІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ……...61

РОЗДІЛ 4 ЗАСТОСУВАННЯ АВТОЛОГІЧНОГО ПЛАЗМІНОГЕНУ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНИХ ДІАБЕТИЧНИХ РАН……..……...73

РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ПЛАСТИЧНОГО ЗАКРИТТЯ РАНОВИХ ДЕФЕКТІВ ХРОНІЧНИХ РАН У ПАЦІЄНТІВ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ……..….95

РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ…….……109

ВИСНОВКИ…….122

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……..….125

Додаток №1 Список публікацій здобувача за темою дисертації……158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

6-АГК-0,2 М- розчином 6-аміногексанової кислоти

ECL-метод підсиленої хемілюмінесценції

HIF-1α-фактор індукований гіпоксією 1-альфа

MMP- матриксні металопротеїнази

NPWT-терапія ран негативним тиском

PBST- розчин знежиреного сухого молока у забуференому фізіологічному розчині що містив 0,05% Triton X-100

PBS-розчин знежиреного сухого молока у забуференому фізіологічному розчині

PEDIS- класифікація синдрому діабетичної стопи: включає оцінку кровопостачання, розміру і глибини виразки, поширення інфекції, а також прояви моторної нейропатії; такому поділу відповідає класифікація інфекції діабетичної стопи за IDSA

Pg- плазміноген

Pg/Pm-система плазміноген/плазмін

Pm-плазмін

pro-MMP-проензими матриксних металопротеїназ

tPA-протеаза тканинного типу

uPA- протеаза урокіназного типу

VEGF - ендотеліальний фактор росту судин

ДППН-діабетична периферична полінейропатія

ECM-позаклітинний матрикс

п-НФГБ-пара-нітрофенілгуанідинбензоат

PAI1-інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (plasminogen activator inhibitor,)

РА-системи активатора плазміногену

КПІ -кісточково-плечовий індекс

САТ-систолічний артеріальний тиск

СДС- синдром діабетичної стопи

ЦД -цукровий діабет

ВСТУП

Актуальність теми. Постійне збільшення кількості хворих на цукровий діабет (ЦД) є значною соціальною та медичною проблемою. За даними Міжнародної діабетичної федерації – IDF (The International Diabetes Federation), в 1996 році в світі нараховувалось до 120 млн хворих, станом на 2021рік хворих на ЦД серед дорослого населення (20–79 років) складає близько 537 млн людей на Земній кулі. Прямі витрати на охорону здоров'я зв'язані з ЦД вже наближаються до одного трильйону доларів США, та перевищать її в 2030р. [34, 111,148,134]. Цьому сприяє збільшення віку та населення планети, ожиріння та малорухомий спосіб життя [8,53,134].

Найбільш серйозними проблемами є пізні ускладнення діабету, які уражають міокард, нирки, сітківку очей та судини нижніх кінцівок. В даному переліку «стопа діабетика» займає провідне місце. За даними літератури при тривалості захворювання більше 20 років, вірогідність ураження судин нижніх кінцівок перевищує 80% [131, 111], а 40-70% всіх нетравматичних ампутацій проводяться у хворих на ЦД, при цьому найближча післяопераційна летальність перевищує 20% [88, 109]. За даними IDF від 25% до 47% випадків госпіталізації хворих на ЦД пов'язано з ураженням стоп. Хронічні ранові дефекти нижніх кінцівок виникають у 15–25% хворих на ЦД, слугуючи безпосередньою причиною високих ампутацій нижніх кінцівок у 12% цих пацієнтів. За даними літератури через 3-5 років після ампутації майже у 50% хворих приходиться ампутувати і другу кінцівку в (з летальністю 39–80%) [102,127,146,]. Гнійно-некротичні ураження стоп у пацієнтів на ЦД відмічаються в 20 раз частіше, ніж у хворих які не страждають на діабет [130,69].

Ураження нижніх кінцівок при цукровому діабеті приносить серйозні збитки економікам країн. На профілактику та лікування «синдрому діабетичної стопи» (СДС) виділяються значні матеріальні ресурси, що дорівнюють 10% національних бюджетів охорони здоров'я, сягаючи 4,6–

13,7 млрд дол. в різних країнах [16,177]. Медична громада світового рівня розробляє та впроваджує клінічні рекомендації та комплексні програми для лікування осіб, які страждають на СДС [84, 160]. Результатом хірургічної тактики лікування СДС, яка включає проведення хірургічної обробки та виконання "малих ампутацій", є формування обширних раневих дефектів [77,121,125]. Утворені рани на фоні цукрового діабету та в результаті спотворення ранового процесу перетворюються в хронічні. Збільшення захворюваності на СДС робить актуальним пошук нових методів місцевого лікування хронічних ран[67,96,232].

Слід зазначити, що усі наявні способи лікування «хронічних ран» при СДС спрямовані на лікування ранових дефектів шляхом мінімізації дії факторів, які перешкоджають загоєнню ран, що полягає у механічному очищенні рани від агресивного середовища, яке формують мікроорганізми. Разом з тим, дані методи лікування ніяким чином не впливають перебіг репаративних процесів у діабетичних ранах, де загоєння, в силу різних чинників, зупинилось на фазі запалення та перейшло у хронічну фазу. У зв'язку з цим, останніми роками проводиться інтенсивний пошук способів впливу молекулярно-клитинних технологій на ініціацію та розрішення запалення саме у «хронічних» діабетичних ранах. Тому наше дослідження було спрямоване на вивчення та регуляцію процесів загоєння у діабетичних ранах на молекулярному рівні. Зокрема, в ході проведеної роботи було оцінено можливість використання аплікацій Pg, виділеного з автологічної плазми крові, як ранозагоювального засобу. Результати фундаментальних наукових досліджень останніх років визначають плазміноген – центральний протеїн системи гемостазу і прозапальний медіатор – як «*master regulator of wound healing»* (ключовий регулятор загоєння ран) [55]. У цьому контексті проведене дослідження є унікальним і не має аналогів у світі.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково – дослідної роботи

Національного медичного університету імені О.О. Богомольця “ Хірургічне лікування хворих з гнійно-некротичними ранами із використанням молекулярно-клітинних технологій” (номер державної реєстрації 0123U101055). Здобувач є співвиконавцем зазначеної НДР. Тема дисертації затверджена Вченою Радою медичного факультету № 1, 10 грудня 2020 р. (протокол № 4).

Мета дослідження. Покращення результатів лікування пацієнтів з синдромом діабетичної стопи шляхом оптимізації процесів загоєння та удосконалення хірургічної тактики із застосуванням клітинних технологій .

Задачі дослідження:

– дослідити експресію регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії разом із активністю матриксних металопротеїназ у біоптатах тканин діабетичних ран та провести порівняльний аналіз експресії даних цитокинів із їх активністю в гострих ранах за умов нормоглікемії;

- дослідження впливу аплікацій автологічного плазміногену на процеси ініціації та розрішення запалення у хронічних ранах у пацієнтів на цукровий діабет, шляхом вивчення та моніторингу біохімічних змін активності цитокинів;

- на основі клінічних, бактеріологічних, біохімічних критеріїв, визначення активності тканинних протеаз дослідити ефективність поєднання аплікацій автологічного плазміногену та автодермопластики у лікуванні ранових дефектів у пацієнтів з синдромом діабетичної стопи;

- на підставі отриманих даних оптимізувати патогенетично обґрунтовані критерії для використання аплікацій автологічного плазміногену в комплексному хірургічному лікуванні пацієнтів із синдромом діабетичної стопи.

- оцінити ефективність нових методів лікування хронічних ран у пацієнтів з синдромом діабетичної стопи.

Об'єкт дослідження: хронічні рани нижніх кінцівок у хворих на синдром діабетичної стопи.

Предмет дослідження: вплив аплікацій автологічного плазміногену на клінічний перебіг загоєння хронічних діабетичних ран. Аналіз ключових білкових регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії в ранових біоптатах та динаміку біохімічних критеріїв перебігу хронічних ран у хворих на СДС на етапах хірургічного лікування.

Методи дослідження: аналіз медичних карт, анкетування, клініко-лабораторні (для встановлення патогенетичної форми, клінічного перебігу ранових процесів у хворих на синдром діабетичної стопи, та оцінки імунологічної реактивності організму), ультразвукове доплерівське сканування судин (з метою оцінки стану магістральних артеріальних судин нижніх кінцівок), ангіграфію нижніх кінцівок, вестерн-блотінг (для визначення експресії регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії), желатинова зимографія (для визначення активності протеаз в біоптатах ран), мікробіологічні (з метою кількісної та якісної оцінки мікрофлори ран), статистичні (для аналізу та узагальнення отриманих результатів лікування).

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційному дослідженні вперше було проведено дослідження експресії регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії разом із активністю ММР у біоптатах тканин діабетичних ран. Проведено порівняльний аналіз експресії даних цитокинів із їх активністю в гострих ранах за умов нормоглікемії. В даному дослідженні нами встановлено, що підвищені рівні ангіостатичних білків, факторів гіпоксії та гіперактивація желатиназ, можуть сприяти невдалому загоєнню ран у пацієнтів із діабетичними ранами як наслідок гіпоксії тканин та гіперглікемії.

На підставі отриманих результатів вперше продемонстровано позитивний лікувальний ефект застосування аплікацій автологічного Pg на поверхню діабетичних ран. Нами встановлено, що місцеве застосування плазміногену, отриманого з плазми пацієнта, має виражений сприятливий ефект для загоєння виразки стопи у пацієнтів з діабетом. Pg може прискорити швидкість загоєння ран шляхом запобігання гіпоксії тканин, зменшення потоку аутофагії, зменшення надмірної активності ММР та посилення ангіогенної відповіді в тканинах рани.

Встановлено, що активність ММР у хронічних діабетичних ранах сягає драматичних значень, в результаті чого самостійне загоєння ран стає неможливим. Застосування аплікацій автологічного Pg дозволяє модулювати дану активність, створити сприятливі умови для загоєння шляхом зменшення надмірної активності ММР, покращення кровопостачання та усунення запальних процесів. Оцінка активності ММР рекомендована для вибору правильної стратегії хірургічного та дермапластичного втручання під час лікування виразки, оскільки високий рівень ММР може призвести до руйнування дермального трансплантату.

Практичне значення отриманих результатів:

- вивчено особливості перебігу загоєння хронічних ран у пацієнтів з нейропатичною формою діабетичної стопи;
- обґрунтовано доцільність застосування аплікацій автологічного плазміногену з метою ініціації запалення хронічних діабетичних ран;
- встановлено покази до диференційованого застосування аплікацій автологічного плазміногену при лікуванні хронічних діабетичних ран;
- на підставі отриманих даних покращено алгоритм хірургічного лікування хронічних ран у пацієнтів із цукровим діабетом;
- проведено доказове обґрунтування готовності рани до пластичного закриття;

- визначення впливу аплікацій автологічного плазміногену на процес загоєння хронічних ран у хворих на синдром діабетичної стопи дало змогу оптимізувати підходи до лікування даної категорії пацієнтів;
- результати дисертаційної роботи впроваджено у практичну діяльність денного стаціонару хірургічного відділення Центральної поліклініки МВС України.

Особистий внесок здобувача. Автор сформулював мету та завдання роботи, самостійно провів пошук літературних джерел та їх аналіз. Приймав активну участь в лікуванні пацієнтів із СДС з їх всебічним клініко-лабораторним та інструментальним обстеженням, результати яких увійшли в дисертаційну роботу. Самостійно проводив оперативні втручання, аплікації автологічним плазміногеном та автодермопластику в переважної більшості хворих. Здобувач здійснив аналіз одержаних результатів з їх статистичною обробкою, сформулював висновки та практичні рекомендації, підготував матеріали до публікації.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення роботи оприлюднено на XXI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Клініко-техногогічні виклики в етапній та реконструктивній хірургії. Вогнепальні та побутові поранення, електрозварювання живих тканин, діабетична стопа». Київ 25-26 листопада 2021р.; науково-практичній конференції з міжнародною участю «актуальні проблеми хірургії стопи». Київ 27 листопада 2021р; на VI Міжрегіональній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології», 6-7 жовтня 2022 р., м. Дніпро, Україна; на конгресі EWMA «Organization of care, pathways and coordination around complex wound healing» Paris, France, 23-25 May 2022; на 33-у конгресі EWMA «Wound care – from art to science» Milano, Italy. 3-5 May 2023; на XV Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Modern Movement of Science» 19-20 жовтня 2023 року м. Дніпро, Україна; Modern Movement of Science:

Proceedings of the 15th International Scientific and Practical Internet Conference, October 19-20, 2023., Dnipro, Ukraine, 76-77 p.

Публікації. За темою дисертаційного дослідження опубліковані 8 наукових працях, у тому числі: 5 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих ДАК МОН України, 3 публікації у матеріалах конференцій і конгресів.

РОЗДІЛ 1.

СУЧАСНІ СТРАТЕГІЇ КОМПЛЕКСНОГО ПАТОГЕНЕТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Особливості патофізіології ранових процесів у пацієнтів із синдромом діабетичної стопи.

Проблема лікування хірургічної інфекції у хворих з цукровим діабетом набула особливої актуальності, що призвело до визнання діабетичної стопи окремою нозологічною формою у 1989 році за міжнародною Сент-Вінсентською декларацією. На сьогоднішній день основоположним документом по СДС прийнято вважати Міжнародний консенсус по діабетичній стопі з прийнятими поправками (International Working Group on Diabetic Foot,2019). Цей документ визначає СДС як інфекцію, виразку та/або деструкцію глибоких тканин, пов'язану з неврологічними порушеннями та/або зниженням магістрального кровотоку в артеріях нижніх кінцівок різного ступеня тяжкості (Консенсус із діабетичної стопи International Diabetic Foot Study Group, 2015). [69, 78,177].

В літературі описаний СДС як патологічний стан, який виникає на фоні ураження периферичних нервів, судин, шкіри, м’яких тканин, кісток, суглобів та проявляються гострими та хронічними виразками, кістково-суглобними ураженнями та гнійно-некротичними процесами, які мають особливий склад мікрофлори і протікають на фоні метаболічної імуносупресії [77,69,92]. Даний синдром зустрічається у 30-80% хворих на діабет [3,122 ,106].

Отже, в хірургічній структурі, синдром діабетичної стопи (СДС) включає трофічні та гнійно-некротичні ураження нижніх кінцівок. Трофічні виразки та хронічні рани становлять 85% всіх уражень, тоді як інша частина включає абсцеси, флегмони, остеомієліти, тендовагініти, гнійні артрити та інші

процеси, що виникають на тлі трофічних виразок або як первинні ураження внаслідок механічної чи термічної травми. [122].

В основі патогенезу СДС лежать ангіопатія, полінейропатія, остеоартропатія які є взаємопов'язаними та взаємо ускладнюючими факторами у розвитку тяжких ускладнень. Дані ускладнення можуть привести як до втрати кінцівки, так і бути реальною загрозою життю пацієнта.

До класичної тріади, що є характерною для синдрому діабетичної стопи (СДС), входять ішемія, нейропатія та інфекція. Виділяють 3 патогенетичні форми СДС: нейропатичну (нейропатичноінфікована) (60–75%), ішемічну (ішемічно-гангренозна) (5–10%), та нейроішемічну (змішана) (20–30%), в залежності від фактору, який переважає в патогенезі [68, 118].

Діабетична периферична полінейропатія (ДППН) (сенсорна, моторна, автономна) – саме розповсюджене ускладнення ЦД, пов'язане із порушенням функції периферичних нервів, яке характеризується наявністю характерних симптомів та/або ознак після виключення інших причин [54,59]. На даний час вважається, що у розвитку нейропатії має значення формування метаболічних зрушень, пов'язаних із гіперглікемією, які призводять до зниження інтраневрального кровотоку[6,132,152,200]. Виникає стан хронічної ішемії нерву, що призводить до зниження швидкості проведення збудження по нервовим волокнам. Послідуючі функціональні та структурні зміни периферійних та автономних нервів визначають початкові зміни у системі мікроциркуляції [131,182]. Так, втрата нейрогенного контролю над прекапілярами в мікросудинному гирлі призводить до їх звуження та порушення гідростатичного тиску, в результаті чого відбувається втрата регуляції артеріального тиску в залежності від положення тіла. Вплив цукрового діабету на нервову систему призводить до розвитку сенсорної, моторної та автономної нейропатії, що виявляються найбільш суттєвими у патогенезі СДС. Проявами сенсорної нейропатії є порушення больовай,

вібраційної і тактильної чутливості. Разом з тим, автономна нейропатія призводить до зниження потовиділення, що призводить до сухості шкіри та появи тріщин, які з одної сторони слугують «вхідними воротами» інфекції, з усіма наслідками, з іншої – причиною утворення виразок на тлі мікроциркуляторних порушень. Симптомами автономної нейропатії є також: головокружіння при переміні положення тіла, нудота, блювота, діарея, дизурія, імпотенція[25,36,47,].

Моторна нейропатія призводить до атрофії та слабкості м'язів стопи, в результаті чого виникає згинальна деформація пальців та порушення ходи. Деформація стопи, в свою чергу, призводить до появи зон підвищеного тертя та тиску, наприклад, під головками метатарзальних кісток та пальців. Наявність на цих ділянках мозолів та гематом, їх інфікування, також є додатковим фактором утворення виразок, остеоартропатії та стопи Шарко [9, 93,205]. Вважається, що саме виразка та її інфікування найчастіше усього призводить до тяжких ускладнень . У 85% випадків, ампутації передує саме виразка стопи [72, 127,].

Ураження симпатичної нервової системи викликає порушення іннервації судин , що призводить до набряку тканин, викликає гіпоксію, порушує процеси загоєння[152,128,94,68].

Наступним патогенетичним механізмом формування СДС, є ураження артеріального русла нижніх кінцівок, який виникає на тлі метаболічних порушень (зовнішні фактори) та генетичної схильності (внутрішні фактори) [121,11,118].Розвиток атеросклерозу нижніх кінцівок при ЦД зазвичай є складним процесом, що включає різноманітні механізми та фактори. Генетична схильність може впливати на розвиток атеросклерозу, інтеракцію генів та середовища, а також взаємодію з метаболічними факторами. Основні механізми, які можуть бути активовані у контексті генетичної схильності до атеросклерозу при ЦД:

1. Зміни у метаболізмі ліпідів: Гени, що регулюють обмін ліпідів, можуть бути активовані, сприяючи збільшенню рівня холестерину та інших ліпідів в крові.
2. Вплив на запалення: Деякі гени можуть бути пов'язані зі збільшеним запаленням в судинах, що може сприяти розвитку атеросклерозу.
3. Окислювальний стрес: Генетична схильність може збільшувати утворення вільних радикалів та окислювальний стрес, що сприяє ушкодженню судинних стінок.
4. Дисфункція ендотелію: Гени, пов'язані з функцією ендотелію (внутрішнього шару судин), можуть бути активовані, сприяючи його дисфункції та виникненню атеросклеротичних змін.
5. Гемодинамічні аспекти: Генетичні варіації можуть впливати на гемодинаміку, включаючи артеріальний тиск та кровотік у судинах, що може сприяти атеросклерозу.
6. Гіперглікемія може зменшити синтез та вивільнення NO, що є важливим молекулярним сигналом для регулювання тонусу судин та запобігання атеросклерозу. Також гіперглікемія може активувати відновлювальні механізми, такі як регуляція експресії генів, що впливають на проліферацію та міграцію клітин судинної стінки, що веде до утворення атеросклеротичних бляшок.

Генетичні механізми активізації генів атеросклерозу досі вивчаються, і розуміння їх ролі в цьому процесі постійно розширюється. Важливо враховувати, що генетичні фактори завжди взаємодіють із середовищем і стильом життя, і комбінація цих факторів визначатиме ризик розвитку атеросклерозу в конкретного пацієнта. [25]. Варіанти розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок при ЦД представлені артеріосклерозом, кальцифікуючим склерозом Монкеберга, хворобою Бюргера [108]

Атеросклероз у пацієнтів ЦД має свої особливості порівняно з особами без цього захворювання. Декілька ключових особливостей розвитку атеросклерозу при ЦД включають:

- Інсулінорезистентність, є характерною для цукрового діабету типу 2, може сприяти розвитку атеросклерозу. Інсулін, який не ефективно функціонує, може впливати на обробку ліпідів та сприяти високим рівням тригліцеридів та низькій концентрації HDL-холестерину.
- Глікозилювання білків: високий рівень цукру в крові може призводити до глікозилювання білків, включаючи ті, що складають внутрішню оболонку судин (ендотелій). Це може призводити до підвищеної проникності та запалення судин.
- Гіперглікемія може викликати окислювальний стрес, що може призводити до окислення LDL-холестерину. Окислений LDL стає більш атерогенним і легше вкладається в стінки артерій.
- Запалення в артеріях може бути збільшеним у пацієнтів з цукровим діабетом. Це сприяє розвитку атеросклерозу, оскільки запалені судини стають більш придатними для утворення бляшок.
- ЦД може супроводжуватися дисліпідемією - порушенням обміну ліпідів. Підвищені рівні тригліцеридів та знижений HDL-холестерин можуть сприяти розвитку атеросклерозу.

Отже, у пацієнтів із цукровим діабетом атеросклероз виявляється в 5 разів частіше, ніж у звичайній популяції. Цей процес швидко розвивається та вражає осіб молодшого та середнього віку, переважно маючи дистальний, мультисегментарний та дифузний характер ураження [102, 115, 171]. Порушення гемодинаміки в периферійних судинах сприяє виникненню критичної ішемії, що, у умовах сенсорної нейропатії, сприяє розвитку гнійно-некротичних процесів [51].

Діабетичні мікроангіопатії проявляються морфологічними змінами в стінках судин. Серед цих змін можливі потовщення базальних мембран, проліферація ендотелію та перицитів, плазматичне просякання стінок судин та гіаліноз. Ці зміни призводять до повної замкненості мікроциркуляції, що, разом з порушенням тромбоцитарного гемостазу, впливає на харчування тканин. Разом із ішемією мікроангіопатія спричиняє розвиток гангрени кінцівки [86, 165].

СДС часто супроводжується серйозними порушеннями роботи імунної системи, що може впливати на бактеріальний склад ушкоджених тканин. Це захворювання часто включає розвиток бактеріальних інфекцій, таких як Staphylococcus aureus, Streptococcus групи та інші аеробні та анаеробні бактерії. Зазвичай виявляється полімікробна інфекція, що означає ураження різними видами бактерій. У 90% випадків виділяють асоціації з участю факультативних і облігатних анаеробних неклостридіальних мікроорганізмів. Це може бути пов'язане з труднощами у лікуванні інфекцій через порушення імунної відповіді. Люди, які страждають від СДС, можуть мати ураження, які менш вразливі до антибіотиків через резистентність деяких штамів бактерій. Зміни в мікробіоті шкіри також можуть впливати на схильність до інфекцій та процесу загоєння ран у цих хворих. Вище зазначені фактори сприяють високому обсіменennю гнійно-некротичних уражень - від 10^6 до 10^11 мікроорганізмів на 1 г, що представляють собою асоціації з участю факультативних і облігатних анаеробних неклостридіальних бактерій. Відповідно до цього, перебіг таких інфекцій є швидким, з перевагою некрозів, супроводжується вираженою інтоксикацією та нерідко може призводити до системної відповіді або сепсису [147, 153, 164].

Гострі рани - це ушкодження або порушення цілісності тканин, яке виникає в результаті різкого, непрогнозованого подразника або травмуючого впливу на організм. Ці рани характеризуються швидким початком інфекційного або запального процесу і можуть включати різноманітні види

травм, такі як порізи, викиди, удари, опіки тощо. Послідовність змін та подій у рановому процесі в таких ранах проходить динамічно та фізіологічно і, в кінцевому результаті, призводить до відновлення цілісності тканин [50, 63]. Хронічна рана - це ураження або пошкодження шкірного покриву або слизових оболонок, яке не загоюється в звичайний термін, визначений для подібного типу травми. Більшість авторів встановлюють 4-тижневий термін для визначення хронічної рани, після якого рановий процес відбувається у спотвореному режимі. Такі рани можуть існувати тривалий час і відзначаються помітною затримкою у процесі загоєння порівняно з нормальним відновленням тканин [177, 96].

Основними факторами, які сповільнюють перебіг ранового процесу у хворих на СДС, є:

- Гіперглікемія. Підвищений рівень цукру в крові може негативно впливати на роботу імунної системи та швидкість загоєння тканин. Також високий рівень цукру призводить до глікації біомолекул, кінцеві продукти якої спричиняють індукцію факторів запалення (фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну–1) та порушують синтез колагену. [19, 140.].
- Мікроангіопатії. Ураження малих судин призводить до порушень кровопостачання, що ускладнює процес загоєння.
- Нейропатія. Пошкодження нервів може призвести до втрати відчуття та порушення моторики, що сприяє утворенню великих, глибоких ран та ускладнює процес їх загоєння.
- Інфекції. Значна бактеріальна забрудненість.
- Атеросклероз. Закупорення артерій холестериновими бляшками обмежує доступ кисню та поживних речовин до пошкоджених тканин, що гальмує процес загоєння.

- Гіпоксія тканин. Зменшення кисневого та поживного потоку в наслідок атеросклерозу та мікроангіопатій сприяє гіпоксії тканин, що ускладнює загоєння.
- Місцева та системна імуносупресія.
- Клітинні фактори. Порушення хемотаксису і фагоцитозу, підвищене утворення вільних радикалів, збільшення вмісту металопротеаз, порушення синтезу колагена, дисбаланс цитокінів, зменшення або відсутність факторів росту, порушення контролю факторів апоптозу в рані, зниження проліферативного потенціалу клітин та ін. [39, 64, 67, 129, 164].
- Зміна біомеханіки стопи, спричинена розвитком остеоартропатії, призводить до утворення непередбачуваних зон підвищеного тиску на поверхні стопи. Це створює умови для хронічної травматизації цих областей. [39,64, 67,129, 164].

Вказані фактори порушують адекватну роботу біомолекулярних та клітинних механізмів, які забезпечують загоєння ран. Це, в свою чергу, впливає на етапи загоєння з найбільш вираженими порушеннями у фазі запалення [164].

Окремо зупинимося на ролі гіперглікемії в патогенезі СДС. Останнім часом досліджені біомолекулярні та клітинні патологічні процеси, які виникають в ранах на фоні підвищеного цукру в крові. Зокрема, спостерігаються порушення міграції лімфоцитів та лейкоцитів через судинну стінку, знижується хемотаксис, а також процеси фагоцитозу і внутрішньоклітинного переварювання, та зменшується їх адгезія до ендотелію судин [40, 66, 181]. Зміни в роботі нейтрофілів і макрофагів призводять до зниження фагоцитарної активності, хемотаксису і адгезії, а також до зменшення бактерицидних можливостей і апоптозу [20, 60]. На фоні цих змін зростає надмірна продукція цитокінів, що викликає розвиток системної запальної відповіді та сепсису [66]. Цитокінова система в значній мірі визначає перебіг

гострого запалення на системному та місцевому рівні, і порушення в її роботі приносить певний вклад в розвиток хронічних ран на фоні ЦД [123].

При ЦД відбуваються різноманітні порушення функції ендотелію, включаючи:

- Зменшення вироблення азоту (оксиду азоту) ендотелієм веде до вазоконстрикції та підвищення артеріального тиску.
- Збільшена продукція реактивних видів кисню та окислення LDL-холестерину призводить до пошкодження ендотелію.
- Підвищена адгезія лейкоцитів та тромбоцитів до ендотелію сприяє розвитку запалення та атеросклерозу.
- Порушення бар'єрної функції ендотелію призводить до збільшення проникнутості судин та витоку білків у навколишні тканини.
- Стимуляція гіпертрофії м'язових клітин судин впливає на структуру та функцію судин.
- Зниження регенерації та відновлення судин ускладнює процес загоєння поранень та подразників.

Пошкодження ендотелію призводить до втрати його протизапальних та антикоагуляційних властивостей. Це може спричиняти виникнення запальних процесів у судинах та сприяти їхньому звуженню. Підвищена проникність викликає набряк тканин, альбумінурію, міграцію ліпопротеїдів.

На фоні порушень згортальної функції крові виникають мікро- та макротромбози. Це призводить до порушень у харчуванні тканин, виникає недостатній місцевий запас факторів росту, та порушується контроль запалення. [13,33,73,138, 162]. Підвищення в рані прозапальних цитокінів та продукція реактивних видів кисню сприяє надмірній активності MMP, які руйнують позаклітинний матрикс (ECM) , він необхідний для епітелізації ранового ложе[64,65,196]. MMP виділяються макрофагами та нейтрофілами під час запалення, і різке збільшення їх активності руйнує фактори росту, які

є необхідними для адекватного загоєння рани. Також виявлено, що на тлі підвищеного рівня цукру в крові формуються кераноцити, які мають обмежені або ускладнені можливості міграції та проліферації, що призводить до сповільнення епітелізації рани [116].

Порушення мітотичної активності, або здатності клітин до мітозу (поділу клітин), є однією з характерних рис хронічних ран порівняно з гострими ранами. Це може бути наслідком ряду механізмів, включаючи хронічну запальну відповідь, порушення сигнальних шляхів і нерівновагу в екологічному середовищі рани. Хронічні рани часто супроводжуються тривалою інфекцією та нестабільним запальним відгуком. Запалення може впливати на мітотичну активність, пригнічуючи проліферацію та впливаючи на функцію клітин. Зміни в екологічному середовищі хронічних ран, такі як підвищення рівня метаболічних відповідей, можуть впливати на життєзабезпеченість клітин і їхню здатність до поділу. Різноманітні порушення в сигнальних шляхах та мітотичних контрольних точках можуть впливати на регуляцію клітинного циклу та поділ клітин. В цілому, порушення мітотичної активності у хронічних ранах є результатом складного взаємодії різноманітних факторів, що включають запалення, інфекцію, анормальні зміни в мікросередовищі та генетичні аспекти[50].

Велика кількість мікроорганізмів в рані викликає більш сильну імунну відповідь, що потребує більше ресурсів для боротьби з інфекцією. Висока вірулентність бактерій призводить до більш суттєвого ураження тканин та важчого перебігу інфекції. Наявність мультирезистентних штамів бактерій може робити інфекції менш чутливими до антибіотиків, ускладнюючи лікування та подовжуючи тривалість захворювання. Утворення мікробних біоплівок створює захисний шар для бактерій, захоплюючи їх у певних умовах і роблячи їх менш доступними для імунного впливу та антибіотиків. Ці фактори, окремо чи у поєднанні, гальмують процес загоєння хронічних діабетичних ран і ускладнювати лікування цих уражень[177,92].

Таким чином , патологічний розвиток ранового процесу у пацієнтів з ЦД обумовлює необхідність пошуку нових методів місцевого лікування хронічних діабетичних ран, що дозволить впливати на репаративні механізми шляхом ініціації та розрішення запалення.

1.2. Актуальні стратегії для всебічного патогенетичного лікування синдрому діабетичної стопи.

Лікування СДС зазвичай включає комплексний підхід, орієнтований на патогенетичні механізми та враховуючий різноманіття проявів цього стану. Основним завданням розроблених схем лікування є збереження опірної функції нижньої кінцівки [101, 131, 169, 199].

Стабільне утримання глюкози на оптимальному рівні є ключовим фактором для попередження та керування ускладненнями, включаючи діабетичну стопу. Загальноприйнятою тактикою є застосування інсулінотерапії у пацієнтів з СДС для досягання нормалізації рівня глюкози в крові, що дозволяє усунути патогенний вплив гіперглікемії на перебіг ранового процесу та нормалізувати механізми загоєння. [37,80,91,113,].

Враховуючи особливості мікробного пейзажу у пацієнтів з СДС вибір антибіотиків повинен охоплювати широкий спектр мікроорганізмів. Визначення ступеня важкості інфекції (легка, середньої важкості, важка) допомагає визначити, чи потрібне амбулаторне лікування, чи госпіталізація. Врахування результатів антибіотикограми допомагає визначити чутливість мікроорганізмів до конкретних антибіотиків, що спрощує вибір ефективного препарату. В залежності від характеру та важкості інфекції може використовуватися як комбінована терапія (з використанням кількох антибіотиків), так і монотерапія. Застосування місцевих антисептиків, мазей або порошків може допомагати в контролі інфекції на раневій поверхні[92,122, 178].

Однією з цілей комплексного лікування СДС є покращення мікроциркуляції, що досягається за допомогою використання компресійного бандажу або струминної компресії для поліпшення венозного відтоку. Крім того, застосовуються ангіопротектори та ліпідознижуючі препарати. Для покращення реологічних властивостей крові використовуються антикоагулянти та антиагреганти [38,39,166]. Однією з головних умов вдалого лікування діабетичної стопи є розвантаження ураженої кінцівки . З цією метою використовують спеціально виготовлене взуття або вкладки що рівномірно розподіляють тиск на стопі та зменшують навантаження на проблемні ділянки. Гелеві або поролонові вставки взуття можуть забезпечувати додатковий амортизаційний ефект та розвантажувати деякі частини стопи. Спеціальні м'які стельки допомагають розподіляти тиск та забезпечувати додатковий комфорт. У деяких випадках використовують спеціальні апарати для розвантаження стопи, які допомагають знімати частину ваги з проблемних ділянок. Спеціальні вправи та фізичні процедури можуть допомагати у відновленні м'язово-суглобового апарату стопи та поліпшенні координації. Також використовують спеціальне взуття яке розвантажує вражену частину стопи (черевик Барука), або розвантажувальну пов'язку із полімерних матеріалів, відому також як Total Contact Cast, є спеціальним застосуванням для лікування виразкових ушкоджень нижніх кінцівок, особливо у пацієнтів з діабетичною стопою. Це захисний обгортковий зачіп (cast), який повністю оточує стопу та гомілку[23, 83].

В терапії хронічних діабетичних ран використовують різні методи місцевого лікування для сприяння загоєнню та запобігання інфекціям. Для зменшення кількості мікроорганізмів застосовують обробку ран розчинами антисептиків: хлоргексидин, декасан, повідон-йод, діоксидин, октанісепт та інші. Для механічного очищення та зволоження рани використовують фізіологічний розчин. Широко застосовуються мазі з ефектом заживлення, які містять антибіотики, стероїди, антисептики або прискорюючі регенерацію

речовини, гелі, які створюють вологе середовище, протеолітичні препарати (трипсин, хемотрипсин), які допомагають очистити рану від некротичних тканин[10, 63,120, 131,141]. Разом з тим, не рекомендовано застосовувати аплікації із протимікробними засобами з метою загоєння ран.

Останнім часом отримали визнання нові інтерактивні ранові покриття, використання яких визначається індивідуально в залежності від стадії ранового процесу[37,85, 136, 187, 192,]. Деякі пов'язки містять агенти із антимікробною дією (мед, йод, срібло, полігексаметилен), а деякі містять речовини, презначені для впливу на репаративні механізми хронічної рани, наприклад впливають на активність поверхневих протеаз [87,101,195]. Розглядається можливість застосування пов'язок, просякнутих октасульфатом сахарози, в якості доповнення стандарту лікування при лікуванні неінфікованих нейропатичних діабетичних виразок [37,187]

Розглядається можливість застосування продуктів, отриманих із плаценти в якості додаткового лікування. [185] Обгрунтування: плацентарні мембрани людини містять комбінацію факторів росту, багатих на колаген, позаклітинний матрикс та клітини, включаючи мезенхімальні стовбурові клітини, неонатальні фібробласти та епітеліальні клітини, які забезпечують необхідні механізми скоординованого загоєння ран. Деякі з факторів та білки, включаючи TGF-β3 та фактор росту людини, антимікробні білки разом із ангіогенними факторами (VEGF, PDGF, фактор росту фібробластів) також присутні у матриксі. [28,95]. В когортному регістровому дослідженні зневодненого алотрансплантата амніотичної мембрани людини з комерційно доступною двошаровою «клітинною конструкцією», середні терміни закриття ран були значно коротшими у тих, хто отримував амніотичну мембрану. Проте пропонується не використовувати фактори роста, аутологічні тромбоцитарні гелі, біоінженерні продукти для шкіри, озон, місцеве застосування двоокису вуглецю та оксиду азоту, в якості основного методу лікування [46, 63,75, 124,159].

Згідно останніх досліджень, застосування багатошарового пластиря із аутологічних лейкоцитів, тромбоцитів та фібрину у пацієнтів хронічними виразками нижніх кінцівок дозволяє зменшити розміри виразки на 50% протягом 4 тижнів [56, 137].

Терапія ран негативним тиском (NPWT) включає накладання пов'язок на рану, через яку прикладається постійний або перемінний негативний тиск, дозволяючи рідині переміститись у контейнер. NPWT стимулює грануляційну тканину та призводить до скорочення площі рани. Разом з тим, було описано потенційні побічні ефекти NPWT, включно з мацерацією рани, «вростання» пов'язок в грануляційну тканину та сприяння розвитку інфекції [29]. В зв'язку з цим, не рекомендовано застосовувати NPWT з метою прискорення загоєння нехірургічних діабетичних ран.

Усі вищеперечилені методи спрямовані на дебрідмент, стимуляцію процесів загоєння в межах фази ранового процесу, проте ніяким чином не впливають на активність ММР, швидкість міграції кератиноцитів до ранового ложа, активність прозапальних цитокінів. Перераховані патогенетичні механізми які відбуваються в хронічних діабетичних ранах змушують хірургів обирати стратегію переводу хронічної рани в гостру, яка при забезпеченні сприятливих умов дозволяє пришвидшити загоєння [19,179,]. Для переводу хронічної рани в гостру проводять хірургічну обробку, яку можна провести скальпелем, ультразвуком, повітряноплазмовими потоками, личинками, лазером, терапією личинками [35,42, 89,145]. Дана тактика хірургічного лікування гнійно-некротичних уражень нижніх кінцівок при СДС допомогає евакуювати некротичний субстрат з ранової поверхні, зменшити активність ендогенних та екзогенних протеїназ (на певний проміжок часу), а при оперативному лікуванні видалити некротичні тканини в межах «здорових» тканин[143]. Про те, це ніяким чином не впливає на ті процеси «хронізації», що вібуваються на молекулярно-клітинному рівні, та домінують у пацієнтів із ЦД.

1.3. Роль системи плазміноген/плазмін у процесах загоєння ран

Загоєння ран - це складний, чітко скоординований процес, який відбувається за низки етапів: коагуляції, запалення, синтезу речовин міжклітинного матриксу, ангіогенезу, фіброплазії, епітелізації, контракції та ремоделювання рубця. Ці події викликані факторами росту та цитокінами, які виділяються в місці рани запальними клітинами та іншими стромальними клітинами (кератиноцитами, ендотеліоцитами, фібробластами, нейтрофілами), у відповідь на пошкодження тканин. Ендогенні протеїнази беруть активну участь у кожній з цих стадій, а саме, зумовлюють протеолітичне очищення рани та лізис фібринового згустку, забезпечують ремоделювання ECM та рекрутинг прозапальних клітин, міграцію кератиноцитів та фібробластів, що, в цілому, є необхідним для адекватного перебігу загоєння. [126, 158,198]

У фізіологічних умовах кожна з фаз загоєння належним чином активується і завершується через координацію великої кількості сигнальних молекул , включаючи цитокіни, хемокіни і фактори росту . Аномальна активація будь якої з цих фаз або відсутність їх завершення призводить до утворення хронічних ран. [41,119]

Згідно визначення спеціального засідання Європейської спілки репарації тканин (Cardiff, Wales, вересень 1996), «…хронічною слід вважати рану, яка не загоюється протягом періоду, який є нормальним для ран подібного типу і локалізації...» [78, 120]. Порушення активаторно-інгібіторного балансу протеолітичних систем вважається однією з найголовніших причин пролонгування загоєння та, як наслідок, переходу рани до хронічного стану. Дослідження останніх років продемонстрували значну роль системи плазміноген/плазмін (Pg/Pm) в процесі загоєння ран.

Плазміноген (Pg)-циркулюючий профермент, кодується геном PLG на 6-й хромосомі. Із плазміногену утворюється білок плазмін. Перетворення

проходить за допомогою системи активатора плазміногену (PA). PA — це протеолітична система, в якій активна протеаза, плазмін, утворюється шляхом перетворення попередника Pg, однією із двох фізіологічних протеаз: протеаза тканинного типу (tPA) або протеаза урокіназного типу (uPA). [167,190,202] Плазмін (Pm) належить до сімейства серинових протеаз і викликає розпад багатьох білків. [82,173]

Pg/Pm проявляє низку плейотропних ефектів в ході процесів, які лежать в основі репарації тканин після пошкодження різними чинниками. Враховуючи здатність плазміногену приймати участь в етапах загоєння тканин деякі автори характерезують його як головний регулятор загоєння *("master regulator").* [55]

Pg накопичується в локусі пошкодження та конвертується на Pm активаторами, локалізованими на поверхні клітин. Зимоген доставляється до місця пошкодження запальними клітинами ще на початкових етапах загоєння. В експерименті на моделі опікових ран у мишей продемонстровано зростання локальної концентрації плазміногену поблизу ділянки пошкодження у ранньому періоді розвитку запального процесу. Більш того, системне введення екзогенного плазміногену нокаутованим за геном *Pg* мишам на фоні опікової патології прискорювало загоєння та утворення рубця.[170] Перетворення плазміногену на активну протеазу в пошкодженій тканині забезпечує, переважно, u-PA, який локалізований на рецепторах моноцитів/макрофагів. Водночас інший активатор празміногену tPA, в ділянці пошкодження, задіяний значно меншою мірою . [184]

Після активації Pm, забезпечує очищення рани від фібрину, нейтрофілів, а також залучається до активації факторів росту та MMP, ремоделювання і формування нової сполучної тканини та судин.[74,144] Важливо відмітити, що характерною ознакою хронічних ран є надмірне накопичення фібрину. Фібринова плівка створює бар'єр для міграції кератиноцитів та забезпечує умови для розвитку інфекційних ускладнень. Оскільки плазмін являється

основним фібринолітиком в організмі, то адекватна робота системи Pg/Pm є важливою умовою забезпечення репаративних процесів. [12]

Інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (plasminogen activator inhibitor, PAI1) є важливим компонентом системи гемостазу, який пригнічує дію активаторів плазміногену урокіназного та тканинного типу. PAI-1 синтезується мегакаріоцитами, під час фрагментації яких інгібітор накопичується в α-гранулах тромбоцитів, що складає 90% загального вмісту інгібітора в організмі людини.[90,97,155] . Однією з причин дефіциту плазмінової активності за стану гіперглікемії може бути підвищена експресія PAI-1. У нокаутованих за геном PAI-1 мишей з СТЗ-індукованим цукровим діабетом загоєння ран шкіри та регенерація м'язової тканини відбувається значно швидше, ніж у тварин з нормальним рівнем інгібітору. Kanno Y та ін. в експериментальному дослідження продемонстрували, що відновлення діяльності плазміну через блокування його інгібітору (α2-AP) сприяє прискоренню загоєння ран шкіри. Механізм даного процесу реалізується через активацію VEGF-індукованого ангіогенезу, опосередкованого фібробластами.[90]

Pm безпосередньо впливає на процес епітелізації ран , про що свідчать результати ранніх досліджень, у мишей з дефіцитом Pg спостерігається затримка загоєння через слабку міграційну здатність кератиноцитів. [163, ,161,186] Ці клітини , здатні зв'язувати зимоген та ініціювати його перетворення на активну протеазу. В експеременті доведено що перицелюлярний Pm активує міграцію свіжоізольованих епідермальних кератиноцитів людини та клітин HaCaT в агарозному гелі. Їхню міграцію повністю блокує інгібітор плазміну α2-AP, що супроводжується інгібуванням проліферації кератиноцитів та втратою хемокінезу. Pm також підсилює знешкодження *Candida albicans* фагоцитами та епідермальними кератиноцитами. Оприлюднені данні вказують на участь Pm в процесі реепітеліалізації шкіри. [79] Дослідження проведене Eriksson, P.O. та ін. показало, що загоєння перфорації барабанної перетинки сповільнюється у

мишей з дефіцитом uPAs і повністю зупиняється у мишей з дефіцитом Pg . [52]

Одну з ключових функцій в процесах загоєння відіграють фібробласти - це клітини сполучної тканини, які здатні синтезувати та продукувати компоненти міжклітинного матриксу (ЕЦМ). Активна участь фібробластів у відновленні ЕЦМ має велике значення для фази ремоделювання тканин в процесі загоєння ран. Встановлено, що в хронічних ранах фібробласти продукують аберантний набір елементів ЕЦМ , це призводить до утворення значних дефектів в структурі міжклітинного матриксу, як наслідок не досягається достатня величина стискання країв рани та утворюється фіброзний рубець. [112]

В експериментальних дослідженнях виявлена здатність Pm підсилювати експресію Cyr61 – гену, який в свою чергу контролює міграцію та клітинну проліферацію фібробластів. Pm є більш потужним мітогеном та міграційним агентом по відношенню до фібробластів, ніж тромбін. Він стимулює синтез ДНК у фібробластах легені миші, ефект виявився дозо залежним. Такого не спостерігається у мишей дефектних за геном рецептора PAR-1, та повністю блокується антитілами проти продукту експресії Cyr61. [2] Також, плазмін сприяв вивільненню протеїну Cyr61 до культурального середовища або ЕЦМ, що робило його доступним для інших клітин. Сприяючи інфільтрації імунних клітин та контролюючи їхню активність плазмін приймає активну участь в загоєнні ран, як на початку, так і на кінцевих етапах цього процесу. [155]

Shen та ін. експериментально довели, що введення Pg мутантним мишам з дефіцитом цього протеїну прискорює загоєння гострих ран, та хронічних ран у мишей з цукровим діабетом. Встановлено, що у хронічних виразках шкіри мишей з експериментальним цукровим діабетом має місце перманентна активація Pg/Pm-системи, з чим пов’язують перехід загоєння до хронічної форми.[133] Проте, механізми, за якими неадекватно функціонуюча протеолітична система бере участь у порушенні загоєння залишаються невідомими. Можна припустити, що однією з причин

дисфункції Pg/Pm-системи може бути локальний дефіцит функіонально повноцінного зимогену, який має місце через його аберантне глікозилювання або активаторно-інгібіторний дисбаланс [58]. Припускається, що значний внесок до хронізації загоєння роблять фрагменти Pg – ангіостатини – які утворюються у пошкодженій тканині за хронічного ранового процесу у надмірній кількості внаслідок підвищеної протеолітичної активності, гальмуючи репаративний ангіогенез [91].

Близько 95% онкологічних хворих, які отримують променеву терапію, мають побічні шкірні ефекти, а у деяких розвивається променеві рани та фіброз. Fallah та ін. Показали що введення плазміногену підсилює загоєння променевих ран за рахунок плейотропної дії на експресію генів. Використовуючи секвенування РНК, вони виявили, що плазміноген подавляє експресію генів TLR, TNF, WNT та сигнальні шляхи – TGF-β головного позитивного регулятору фіброзу. Також плазміноген підсилює протизапальний ефект арахідонової кислоти, значно зменшуючи запалення в променевих ранах, і покращуючи ремоделювання грануляційної тканини у порівнянні з плацебо лікуванням. Крім того, Pg індукував метаболічні зміни, включаючи зниження гліколізу. Важливо відмітити, що виявлені фактори, які регулює плазміноген, являються профіброзними. Тому при променевих ранах з надмірним запаленням, Pg здатний посилювати та перенаправляти процес загоєння, таким чином що він більше нагадує фізіологічне із значно меншим ризиком розвитку фіброзу. [55]

Оскільки Pg пригнічує продукування TGF-β та інших профібротичних факторів, ця обставина дозволила підтвердити важливість функціонування Pg як модулятора утворення фіброзної тканини. Автори іншої роботи (Okunishi та ін., 2011) запропонували використання Pm як нового терапевтичного засобу для контролювання відкладання колагену фіброзними фібробластами. [135]

Останні проведені дослідження показали позитивний результат використання фібринового каркасу наповненого плазміногеном в лікуванні

ран у діабетичних мишах. Фібриновий каркас, наповнений плазміногеном, застосовуваний у діабетичних мишах на всю товщину значно підвищив швидкість закриття ран, ніж каркас, який використовується як еталонний матеріал. Гістологічний аналіз продемонстрував покращену реепітелізацію та відкладення колагену в грануляційній тканині в миші, які отримували фібриновий каркас, наповнений плазміногеном, порівняно з ненавантаженим фібриновим каркасом. [4]

Оскільки у світі відмічається тенденція до старіння населення, збільшення захворюваності на цукровий діабет, онкологічні хвороби та захворювання серцево-судинної системи, проблема лікування хронічних виразок стає актуальнішою. Рани які тривало не загоюються, надалі стають причиною інвалідності, погіршення якості життя, потребують значних затрат на лікування. [203] Незважаючи на появу хірургічних, медикаментозних інновацій лікування гнійно-некротичних ран є тривалим і часто безуспішним. Нові методи лікування, ймовірно, еволюціонуватимуть від простого відновлення фізіологічного процесу до стимуляції регенераційної здатності пошкодженої тканини. Ця тенденція потенційно може задовольнити значні потреби в лікуванні хронічних ран.[49] Результати попередніх досліджень показують, що система плазміноген/плазмін приймає участь в багатьох ланках процесу загоєння, і дослідження впливу її на механізми які розвиваються в хронічних ранах має великий практичний потенціал.

Таким чином, дані літератури вказують на те, що проблема лікування гнійно-некротичних уражень нижніх кінцівок у пацієнтів з СДС не до кінця вирішена, тому пошук нових засобів лікування цих хворих залишається актуальним. Застосування аплікацій аутологічного плазміногену створює сприятливі умови для загоєння ранових дефектів, але потребує свого подальшого вивчення. Саме цим питанням і присвячене дисертаційне дослідження.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

2.1. Методичний підхід

Для вирішення задач дослідження обрано наступний методичний підхід. На першому етапі було вивчено віддалені результати хірургічного лікування хворих на хронічні рани у пацієнтів із синдромом діабетичної стопи, які знаходились на амбулаторному лікуванні у хірургічній клініці кафедри хірургії №2 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця за період 2017-2020 рр. 36 осіб. Аналіз результатів лікування дозволив визначити шляхи їх покращення, що включало в себе застосування удосконаленої методики лікування хворих, розробку та апробацію нових способів лікування ран. В результаті було удосконалено технологію хірургічного лікування хворих на хронічні рани у пацієнтів із нейропатичною формою синдрому діабетичної стопи, яка була апробована в клініці за період 2020 – 2023 рр. 45 осіб.

Для визначення ефективності застосування аплікацій автологічного плазміногену хворі були поділені на 2 групи – контрольну та досліджувану. Пацієнти контрольної групи отримували стандартне лікування, пацієнти досліджуваної групи – разом із стандартним лікування отримували аплікації автологічного плазміногену на хронічні рани.

Сформовані таким чином групи хворих за основним діагнозом, класифікаційними характеристиками діабетичної стопи, об’ємом хірургічного лікування, статтю, віком, супутньою патологією та іншими суттєвими ознаками були репрезентативними. Тому результати порівняльного аналізу методів ефективності лікування пацієнтів обох підгруп можна вважати достовірними.

Більш детальні результати порівняльного аналізу представлені у розділах присвячених власним дослідженням.

У дослідженні ми використовували класифікацію PEDIS (Perfusion, Extent, Depth, Infection, Sensation) яка була запропонована в 2003 р. та переглянута в 2011р., вона враховує не тільки глибину уражених тканин, а і стан периферичного кровопостачання, інервації, важкість інфекційного процесу. Її застосування пред'являє детальну інформацію про наявне пошкодження лікарям, які займаються лікуванням СДС на різних етапах (хірургічний та ендокринологічний стаціонар, поліклініка). [30, 151]

Класифікація PEDIS описує:

P (perfusion) – зміни кровотоку нижньої кінцівки;

E (extent/size) – розмір дефекту тканин (виразки) стопи;

D (depth/tissue loss) – глибину ураження анатомічних верств стопи;

I (infection) – ступінь вираженості інфекційного процесу;

S (sensation) – порушення чутливості.

Перший показник - перфузію нижніх кінцівок (P) - оцінюють за критеріями, запропонованими робочою групою TASK.

• I стадія - відсутність клінічних проявів в комбінації з одним з критеріїв:

- Пальпаторно визначають пульсацію на дорсальній артерії стопи або задній тібіальной артерії;

- Кісточково-плечовий індекс (КПІ - відношення систолічного артеріального тиску (САТ) на тібіальних артеріях на рівні середньої третини гомілки до САТ на плечовій артерії) - 0,9-1,1;

- Індекс співвідношення САТ на плечі і великому пальці стопи> 0,6;

- Показник транскутанної напруги кисню на стопі (TcpO2)> 60 мм рт. ст.

• II стадія - симптоми або ознаки периферичної ангіопатії, але без критичної ішемії нижніх кінцівок:

- Переміжна кульгавість;

- КПІ <0,9, але САТ на гомілки> 50 мм рт. ст.;

- Індекс співвідношення САТ на плечі і великому пальці стопи <0,6, але САТ на великому пальці стопи> 30 мм рт. ст.;

- TcpO2 - 30-60 мм рт. ст.;

- Інші симптоми або результати неінвазивних методів дослідження, які вказують на периферичну ангіопатії (але не критичну ішемію нижніх кінцівок).

• III стадія - критична ішемія нижніх кінцівок:

- САТ на гомілки <50 мм рт. ст.;

- САТ на великому пальці стопи <30 мм рт. ст.;

- TcpO2 <30 мм рт. ст.

Наступний показник за класифікацією PEDIS - розмір виразкового дефекту (E) :

• Стадія 1-розмір рани до 1 $см^2$

• Стадія 2-розмір рани від 1$см^2$ до 3$см^2$

• Стадія 3-розмір рани від 3$см^2$

Розмір рани оцінюють після проведення некректомія в межах здорових тканин. Краєм виразки слід вважати ділянку здорової тканини, що оточує дефект. Для визначення розмірів використовують сітчасті трафарети, а також метод «калькуляції» - множення максимального діаметру на перпендикулярний йому розмір. Розроблені і спеціальні комп'ютерні програми, що дозволяють точно і швидко визначити розмір виразкового дефекту по фотографії.

Глибину дефекту (D) також оцінюють після проведення первинної хірургічної обробки рани за такими критеріями:

• Стадія 1 - поверхнева виразка, яка зачіпає всі шари шкіри, але не пенетрує інші структури.

• Стадія 2 - глибока виразка, яка залучає в патологічний процес фасції, м'язи та сухожилля.

• Стадія 3 - залучені всі структури стопи, у тому числі кістки та / або

суглоби.

Якщо за візуальною оцінкою виразка не поширюється за межі шкіри, але є клінічні прояви інфекції більш глибоких шарів (абсцес, остеомієліт), такий дефект розцінюють як глибоку виразку.

Поширення інфекційного процесу (I) оцінюють наступним чином:

• Стадія 1 - відсутність симптомів інфекційного процесу.

• Стадія 2 - інфекційний процес поширюється тільки на шкіру і поверхневі шари підшкірної клітковини (еритема і целюліт навколо виразки не більше 2 см) без залучення більш глибоких шарів і ознак генералізації процесу. Необхідна наявність 2 або більше ознак запалення: демаркація , почервоніння, біль, набряк, локальна гіпертермія.

• Стадія 3 - відсутність генералізації процесу, однак наявність одного або більше таких місцевих ознак, як еритема і целюліт навколо виразки більше 2 см, лімфангіт, поширення глибше поверхневої фасції, абсцес м'яких тканин стопи, гангрена, залучення м'язів, сухожиль, кісток і / або суглобів.

• Стадія 4 - генералізація інфекційного процесу на тлі декомпенсації ЦД (лихоманка, озноб, тахікардія, гіпотонія, лейкоцитоз, порушення свідомості, виражена гіперглікемія, ацидоз, азотемія).

Діагностувати остеомієліт при СДС допомагають такі методи дослідження, як біопсія кісткової тканини з проведенням гістологічного і бактеріологічного дослідження, КТ ,МРТ, сцинтиграфія, проба зондом, в значно меншій мірі - пряма рентгенографія.

Наявність порушень чутливості (S) визначають за допомогою 10 г монофіламента (тактильна чутливість) і камертона 128 Гц або вібраційного генератора (вібраційна чутливість).

2.2. Загальна характеристика хворих

Дослідження основане на порівняльному аналізі результатів обстеження та хірургічного лікування хворих, що страждали на хронічні рани на тлі

цукрового діабету 2 типу . Усі пацієнти знаходились на лікуванні у хірургічній клініці кафедри хірургії №2 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця за період 2017 р. до 2023 р.

2.2.1 Характеристика ретроспективно оціненої групи пацієнтів

Керуючись метою та задачами дослідження та спираючись на обраний методичний підхід, хворі, які лікувались у клініці за період 2017 – 2020 рр. були виділені в І групу – 36 пацієнтів.

Склад хворих за віком та статтю представлено у таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Склад хворих за віком та статтю

Вік (роки)	1-а група (36 хворих)			
	чоловіки	Жінки	Всього	
			абс	%
40-49		1	1	2,8%
50-59	3	7	10	27,8%
60-69	6	9	15	41,7%
70 та старше	4	6	10	27,8%
Всього	13 (36,2%)	23 (63,8%)	36 (100%)	 (100%)

Як видно із матеріалів, наведених у таблиці, співвідношення чоловіків та жінок становило 1:1,8, а 98,8% хворих були у віці старше 50 років та старше. Середній вік хворих складав 65,4±4,3 роки. Таким чином дана патологія

зустрічалась переважно у пацієнтів при більшій частоті осіб жіночої статі, що відповідає даним, описаним у літературі [31]

Тривалість захворювання у обстежених хворих на цукровий діабет становила від 8 до 23 років у середньому складала 10,2±3,6 років. Тривалість існування хронічної рани на ступні при зверненні у клініку становила від 3 місяців до 2 років. Усі пацієнти мали субкомпенсовану стадію цукрового діабету та нейропатичною форму ураження діабетичної стопи.

Із 36 пацієнтів 19 в минулому перенесли оперативне втручання з приводу гнійних процесів на ступні (розкриття флегмони, абсцесів, ампутації пальців). У 17 пацієнтів мали місце трофічні виразки. Усі пацієнти мали I ступінь ураження тканин стопи згідно класифікації PEDIS та носили хронічний характер, тобто процес загоєння тривав більше 4 тижнів [151]

Аналіз анкет вказує на те що більшості пацієнтів не проводилась адекватне лікування цукрового діабету(81,2%), вони не контролювали глікемію, відмовилось від таблетованих цукрознижуючих препаратів, або інсуліну. Також пацієнти не відвідували подолога, та не проводили належного догляду за кінцівками. Наявність у хворих супутніх патологій вимагало комплексного підходу до лікування із залученням суміжних спеціалістів.

2.2.2 Характеристика проспективно досліджуваної групи пацієнтів

В дослідженні взяли участь 45 пацієнтів , що лікувались у хірургічній клініці (Центральна поліклініка МВС України, денний стаціонар) за період 2020 – 2023 роки, та страждали на нейропатичну форму діабетичної стопи.

Критеріями включення до дослідження були наявність у пацієнта ЦД 2 типу із хронічними ранами нижніх кінцівок.

До критеріїв не включення:

- ЦД 1-го типу;
- критична ішемія нижніх кінцівок (САТ на гомілки <50 мм рт. ст., САТ на великому пальці стопи <30 мм рт. ст.,ТсрО2 <30 мм рт. ст.)
- хронічна серцева недостатність 2-3-го ступенів і трофічні виразки на нижніх кінцівках кардіального походження;
- трофічні виразки внаслідок венозної недостатності;
- помірні або тяжкі порушення функції нирок із кліренсом креатиніну менше від 50 мл/хв.;
- верифікований стан інфікування хворого вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ);
- активний гепатит В або С;
- лікування злоякісних новоутворень: хіміотерапія, променева терапія або імуносупресанти, імуномодулюча терапія моноклональними антитілами тощо.

Критерії виключення:

- прогресуючі стани хронічних захворювань (хронічна серцева недостатність 2-3-го ступенів, наростаюча ниркова неростатність з кліренсом креатиніну менше від 50 мл/хв.);
- відмова хворого від продовження лікування.

Склад хворих за віком та статтю пацієнтів представлено у таблиці 2.2

Таблиця 2.2

Склад хворих за віком та статтю

Вік (роки)	45 хворих			
	Чоловіки	Жінки	Всього	
			абс	%
40-49		4	4	89
50-59	2	5	7	15,6
60-69	8	15	23	51,1
70 та старше	4	7	11	24,4
Всього	14 (31%)	31 (69%)	45 (100%)	(100%)

Наведені у таблиці матеріали свідчать про те, що співвідношення чоловіків та жінок у досліджуваній групі становило 1:2.1, а питома вага пацієнтів старше 50 років становила 91,1%. Середній вік хворих складав 65,4±4,3 роки. Тривалість захворювання у обстежених хворих на цукровий діабет становила від 10 до 25 років у середньому складала 12,6±2,4 років. Тривалість існування хронічної рани на час звернення у клініку становила від 3 місяців до 2 років. Усі 45 пацієнтів мали субкомпенсовану стадію цукрового діабету та нейропатичну форму ураження діабетичної стопи.

Причинами хронічних ран даної групи хворих були: перенесені в минулому оперативні втручання (санація гнійних процесів на ступні та ампутація пальців). До участі у дослідженні залучали пацієнтів із діаметром ранових дефектів від 1,0 до 32,0 см^2. Розподіл хворих за згідно класифікації PEDIS, наведено в таблиці 2.3

Таблиця 2.3

Розподіл пацієнтів з хронічними ранами за класифікацією PEDIS

Параметр Рани	Ступень вираженості	НІФ СДС (n=45)
Кровоток (perfusion)	I ст. (відсутні ознаки ХАН)	38
	II ст. (є ознаки ХАН, але відсутня критична ішемія)	7
Розмір ($см^2$)	IIIст.	45
Глибина (depth)	I ст. поверхнева рана в межах шкіри	28
	II ст. ураження підшкірної основи, м'язів, сухожилок, зв'язок	17
	III ст. ураження кісток, суглобів	-
Інфекція (infection)	I ст. немає ознак інфекції	35
	II ст. інфекція шкіри та підшкірної основи, гіперемія довкола < 2см	10
Чутливість (sensanion)	I ст. чутливість збережена	0
	II ст. втрата тактильної та вібраційної чутливості	45

Пацієнтів порівняльної групи було розділено на дві підгрупи (досліжувану та групу контролю). Всім пацієнтам проводилась консервативна терапія за загальноприйнятими схемами. Пацієнтам контрольної підгрупи (n=25) призначали місцеве лікування ран, яке включало застосування ранових покриттів (сорбуючі пов’язки, гідрогелеві пов’язки, покриття на основі вазеліну та парафіну), обробку ран розчином натрію хлориду0,9%, антисептиками (повідон-йод, хлоргексидон 0.05%). Використовували NPWT

для зменшення площі рани, зменшення ексудації та очищення рани від фібрину, терміном на 3 дні в перемінному режимі -125 мм рт.ст.. Обов'язковим було розвантаження ураженої ділянки стопи. Пацієнти дослідної групи отримували аплікації автологічного плазмінногену на ранову поверхню один раз на два дні.

2.3. Характеристика методів обстеження

Усім хворим проводилося комплексне обстеження, яке включало збір скарг та анамнезу захворювання, фізичне обстеження, лабораторні та інструментальні методи дослідження. Це дозволило визначити важкість цукрового діабету, поширеність гнійно-некротичного процесу, патогенетичну форму синдрому діабетичної стопи. Обов'язковою була консультація ендокринолога та, при необхідності, консультація інших суміжних спеціалістів. Лабораторні методи включали : загальний аналіз крові з формулою, біохімічний аналіз крові,коагулограму, рівень глікемії, загальний аналіз сечі.

Ступінь гемодинамічних змін в нижніх кінцівках оцінювали за допомогою розрахунку плече-кісточкового індексу (КПІ) та ультразвукового дуплексного сканування артерій нижніх кінцівок апаратом TOSHIBA" Nemio XG SSA–580A з використанням датчиків 4–5 МГц для великих і 8–10 МГц для середніх та дрібних судин.

КПІ=АТ АГ/АТ ПЛА

де: АТ АГ – систолічний тиск у передній або задній гомілковій артерії, мм рт. ст; АТ ПЛА – систолічний тиск у плечовій артерії, мм рт. ст.

Усім пацієнтам проводили дослідження біоптатів тканин до початку лікування та на 18 добу лікування. Рівні регуляторних білків, пов'язаних з репаративними процесами та загоєнням ран, таких як фактор індукований гіпоксією-1α, (HIF-1α), фактор росту ендотелію судин (VEGF), ангіостатини та маркер аутофагії LC3, вимірювали за допомогою вестерн-блоттингу ,

активність ММР визначали методом желатинової зимографії, на початку лікування та на 18 добу проведеного лікування. Відбір матеріалу та підготовку дослідного матеріалу виконували за спеціальною методикою.

Пробопідготовка. Зразки тканини ранової поверхні подрібнювали у порцеляновій ступці зі скрапленим азотом та гомогенізували у лізуючому буфері наступного складу: 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 5 мМ ЕДТК та коктейль інгібіторів фосфатаз та протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, ThermoScientific, USA, # A32961). Співвідношення тканина : буфер становило 1:5 (m/v). Після гомогенізації зразки додатково дезінтегрували ультразвуком та центрифугували при 16 тис. g протягом 45 хв. при 4 ^{o}C. Супернатанти відбирали, переносили до пластикових пробірок типу Епендорф та вимірювали в них концентрацію загального протеїну спектрофотометрично за методом [100]. Зразки протеїнів для проведення електрофорезу готували з використанням буферу Леммлі, що мав наступний склад: 62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 10% β-меркаптоетанол, 10% гліцерол 0,001% бромфеноловий синій, у співвідношенні супернатант : буфер Леммлі – 2 : 1. Після приготування суміші прогрівали за 95 ^{o}C протягом 5 хв.

Електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE). Електрофорез у 8 % PAAG за присутності 0,1% SDS проводили за класичною методикою, описаною раніше [188]. Для проведення електрофорезу використовували камеру для вертикального гель-електрофорезу виробництва BioRad (США). Для полімеризації акриламіду при формуванні концентруючого (pH 6,8) та розділяючого гелів (pH 8,8) використовували ТЕМЕД та 10%-й розчин персульфату амонію. Концентрація протеїнів становила 100 мкг на доріжку гелю. Буферний розчин, який містив 25 мМ трис-HCl (pH 8,3), 0,192 М гліцин та 0,1% SDS, використовували як електродний буфер. Концентрування зразків проводили при напрузі 30-35 В (15-18 мА),

розділення – 45-50 В (30-35 мА). Після закінчення електрофоретичного розділення гелі обережно виймали з камери та промивали у трансфер-буфері, що містив 25% метанолу, та використовували для проведення імуноблот-аналізу.

Імуноблотинг. Імуноблот-аналіз досліджуваних протеїнів з біоптатів хронічних діабетичних ран проводили за методикою [5, 32,] з мінорними модифікаціями. Після електрофоретичного розділення протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом електроблоту, використовуючи буферний розчин, що містив 0,025 М Tris-HCl, 0,192 М гліцин та 25% метанол. Напруга при переносі складала 35-45 В при силі струму 200-230 мА, тривалість переносу – 120 хв.

Після переносу місця неспецифічного зв'язування антитіл на мембрані блокували 5% розчином знежиреного сухого молока у забуференому фізіологічному розчині (PBS), що містив 0,05% Triton X-100 (PBST), протягом 90 хв. за 37 ^{o}C, після чого мембрани інкубували з відповідними первинними антитілами, взятими у розведеннях згідно з рекомендаціями виробника. У роботі використовували наступні первинні антитіла: до HIF-1α, VEGF, ангіостатинів. Після інкубації з первинними антитілами мембрани відмивали 6 разів по 7 хв. PBST для видалення неспецифічно зв'язаних антитіл та обробляли відповідними анти-видовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрону, протягом 120 хв. за 37 ^{o}C. Усі вторинні антитіла розводили у 5% розчині протеїнів молока або 3% розчині BSA у PBST. Після інкубації мембрани промивали PBST у режимі, зазначеному вище. Імунореактивні зони візуалізували за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0,25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0,09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0,1 М трис-HCl (pH 8,5) та 0,0035% H_2O_2, авторадіографією на рентгенівських плівках, як описано раніше [104]. У залежності від інтенсивності сигналу хемілюмінісценції час експозиції мембрани на плівці становив від 5 секунд до 10 хв. Для проявлення плівок їх обробляли комерційними розчинами

проявнику та фіксажу. Після проявлення плівки сканували, напівкількісний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою денситометрії забарвлених імунореактивних зон, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, Nonlinear Inc, США). Молекулярну масу протеїнів у зразках визначали, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням на нітроцелюлозній мембрані забарвлених маркерів Page Ruler^{TM} Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, Литва, кат. № 26619) у діапазоні 10-230 кДа.

Ензим-форез (желатинова зимографія). Желатинова зимографія як різновид ензим-форезу використовувалася у роботі для детекції активних колагенолітичних ензимів (матриксних металопротеїназ, ММР) у зразках ранової поверхні ран шкіри та ексудатів хронічних ран за методикою, описаною раніше [139], з мінорними модифікаціями. Зразки для нанесення готували аналогічним чином, як описано вище, використовуючи для цього невідновлюючий буфер Леммлі. Безпосередньо перед нанесенням зразки нагрівали за температури не вище 37 ^{o}C протягом 5 хв. Електрофоретичне розділення протеїнів в ході зимографії проводили у пластині сополімеру 8 % PAAG та розчинного желатину (3 мг/мл) за присутності 0,1% SDS за умов, описаних вище. Концентрація загального протеїну становила 25-100 мкг на лунку. Після закінчення електрофорезу гель двічі відмивали в охолодженому 2,5% розчині Triton X-100 для видалення SDS та ренатурації протеїнів, а потім промивали у п’яти змінах холодної бідистильованої води. Для розвитку колагенолітичної активності проводили інкубацію гелю при 37 ^{o}C протягом 16 год. у розчині наступного складу: 0,05 мМ трис-HCl (pH 7,6), 0,15 М NaCl, 0,01М $CaCl_2$, 0,05 М $ZnCl_2$, 0,05% Tween-20 та 0,02% NaN_3. В ході термостатування желатинази, розділені в гелі, розщеплювали субстрат. Далі гелі забарвлювали барвником Coomassie Brilliant Blue R-250, розчиненим у водній суміші 10% оцтової кислоти та 30% етанолу. Знебарвлення гелів проводили у розчині, що не містив барвника. Присутність активних ММР, їхніх комплексів та активованих проензимів (pro-ММР) визначали за

наявністю світлих смуг на темнозабарвленому тлі, при цьому інтенсивність та площа смуг вважалися пропорційними активності ензимів. Молекулярну масу ММР визначали за допомогою паралельно розділених стандартних маркерів молекулярної ваги. Денситометричний аналіз зимограм проводили з використанням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США).

Отримання Glu-плазміногену з плазми крові донорів

Glu-плазміноген одержували зі свіжої цитратної плазми крові донорів (хворі на цукровий діабет) методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну (10 мг/мл) за [104] з мінорними модифікаціями. Об'єм колонки становив 150 $см^3$. Відмивку колонки від неспецифічно зв'язаних протеїнів плазми проводили 0,1 М забуференим натрій-фосфатним фізіологічним розчином (Na-PBS), pH 7,4. Елюцію плазміногену проводили 0,2 М розчином 6-аміногексанової кислоти (6-АГК), розчиненої у 50 мМ Na-PBS, pH 7,4. Для інактивації можливих домішок плазміну до одержаних препаратів плазміногену вносили інгібітор пара-нітрофенілгуанідинбензоат (п-НФГБ) у кінцевій концентрації 10^{-4} М, витримували протягом 30 хв. за 20°С, після чого препарати плазміногену діалізували протягом 6 год. проти 5 змін 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,4), що містив 0,15 М NaCl (TBS).

Концентрацію протеїну у препаратах плазміногену визначали спектрофотометрично, вимірюючи поглинання протеїну за довжини хвилі 280 та 320 нм та використовуючи у розрахунках коефіцієнт молярної екстинкції плазміногену $E_{1\%,1см}$ = 1,7. Чистоту одержаних препаратів плазміногену оцінювали за допомогою гель-електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі за присутності 0,1 % SDS (рис.). Результати гель-електрофорезу свідчать, що препарати ізольованого з плазми крові донорів Glu-плазміногену були електрофоретично гомогенними та високоочищеними (ступінь очистки 99%)[191].

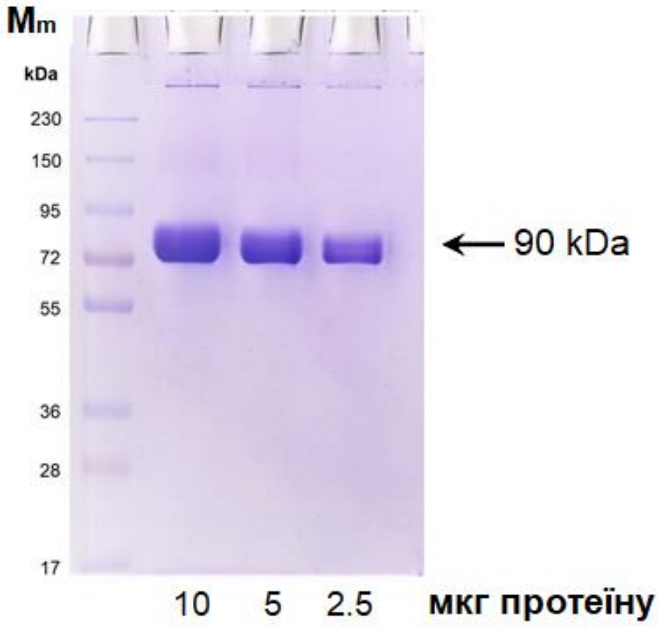


Рисунок 1. – Електрофореграма препарату плазміногену, ізольованого з плазми крові пацієнтів за допомогою афінної хроматографії на Lys-сефарозі-4B.

Одержані препарати плазміногену перевіряли на наявність спонтанної амідолітичної активності за допомогою фотометричного методу з використанням специфічного хромогенного субстрату плазміну S_{2251} та використовували лише ті, які не проявляли спонтанної протеолітичної активність. Препарати плазміногену зберігали за –20°С до використування.

Методика визначення площі поверхні ран

Визначення площі рани являється об'єктивним способом оцінки перебігу ранового процесу, що дозволяє провести порівняльний аналіз ефективності лікування. В дослідженні використовували програму imito Wound 2.0.0.17 (розробник компанія ImitoAG Німеччина) на програмному забезпеченні системи Android. Imito Wound – перший медичний додаток, який вимірює площу шкірних вогнищ, новоутворень, або виразок будь якої форми без додаткових інструментів. Також програма дозволяє виконувати збереження і аналіз динаміки росту або загоєння.

Для вимірювання площі, рани фотографували разом із лінійкою. Щоб отримати точні дані, лінійку розміщували на одному рівні з об’єктом та проводили калібрування, після чого краї рани обводили за допомогою курсора. Програма Imito Wound проводить автоматичний підрахунок пікселів обведених фігур і розрахунок площі об’єкта, що вимірюється по пропорції: https://imito.io/imitowound.

Для калібрування лінійних розмірів на зображенні використовується лінійка або маркер. Розмір рани виражали в см2. Швидкість закриття рани як зміни відносних розмірів рани розраховували за такою формулою:

Relative wound size (%) = (original wound area – wound area remaining)/original wound area × 100% [18]

Відносний розмір рани (%) = (початкова площа рани – залишкова площа рани)/початкова площа рани × 100% [18]

Рисунок 2. Фотографії хронічного ураження шкіри з вимірюванням площі за допомогою програми Imito AG (принтскріни смартфона). Експерт обводить краї рани, щоб визначити площу поверхні. Програмне забезпечення обчислює площу шляхом підрахунку пікселів зображення після того, як воно було масштабовано за допомогою маркера, розміщеного в одній площині з раною.

Статистичні методи

Реалізація поставлених перед статистичним аналізом задач досягалась шляхом використання пакетів програм статистичної обробки в біології та медицині. Для аналізу даних вестерн-блотів і зимографії використовувався критерій У Манна-Уїтні для оцінки відмінностей між середніми параметрами. Усі змінні були виражені як середнє ± стандартна помилка середнього (S.E.M.). Для всіх тестів $P<0,05$ вважалося статистично значущим. Для виконання всіх статистичних розрахунків використовувалося програмне забезпечення «OriginPro» (основна версія 9.0 SR2 Pro English).

РОЗДІЛ 3.

ОСОБЛИВОСТІ БАЛАНСУ ОСНОВНИХ РЕГУЛЯТОРІВ АНГІОГЕНЕЗУ ТА АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ -2,-9 У ХРОНІЧНИХ ВИРАЗКАХ ПАЦІЄНТІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Хронічні рани є однією з найсерйозніших проблем зі здоров'ям у всьому світі. Більшість шкірних ран, пов’язаних із діабетом, переходять у хронічну форму, особливо на нижніх кінцівках. Синдром діабетичної стопи, або діабетична виразка стопи, вважається одним із найнебезпечніших ускладнень цукрового діабету, що призводить до 84% ампутацій стоп [7]. Проблеми лікування діабетичної стопи пов'язані зі складністю основних патологічних процесів, які залишаються недостатньо вивченими. Загоєння ран є дуже складним біологічним механізмом, що включає високоорганізовану послідовність чотирьох пересічних фаз (гемостаз, запалення, клітинна проліферація/міграція та ремоделювання тканин), які синхронізовані просторово та в часі. Збій на одному з етапів загоєння переводить процес в хронічну форму [125, 187]. Важливу роль в якому відіграють протеази, забезпечуючи деградацію позаклітинного матриксу (ECM), ремоделювання тканин, міграцію клітин. Не адекватне функціонування протеолітичної системи в пошкодженій шкірній тканині можуть призвести до порушення загоєння дермальних ран [61].

Протеази беруть активну участь у процесах відновлення ран, тому оцінка протеолітичної активності використовується як біомаркер стану загоєння ран. Матриксні металопротеїнази (ММР) відіграють вирішальну роль у різних деструктивних запальних процесах в тканинах шляхом деградації білків позаклітинного матриксу та компонентів базальної мембрани. Серед усіх желатиназ, ММР-2 і -9 зазвичай беруть участь у нормальному ремоделюванні тканин під час загоєння ран [158]. Однак, як

повідомляється, гіперактивація ММР є ключовим фактором погіршення загоєння ран при діабетичних виразках шкіри та інших судинних ускладнень. ММР, імовірно, сприяють поганому загоєнню ран та інгібують репаративний ангіогенез шляхом утворення ангіостатинів, які можуть бути розщеплені з плазміногену [173]. Ангіостатини спричиняють апоптоз ендотеліальних клітин, ефективно інгібують їхню проліферацію та міграцію. У контексті ангіогенного балансу ангіостатини вважаються одним з основних ендогенних інгібіторів росту судин, протидіючи проангіогенній дії судинного ендотеліального фактора росту фактора (VEGF) та інших ангіогенних регуляторів [27,173]. Добре відомо, що індукція експресії VEGF має велике значення для активації ангіогенезу в пошкоджених тканинах для забезпечення належного загоєння ран. Разом з тим, раніше повідомлялося, що зниження ангіогенної здатності хронічних ран не завжди може бути пов'язане зі зниженням експресії VEGF[149].

В хронічних діабетичних ранах механізм гіпоксії тканин виникає в результаті мікротромбозу судин, набряки тканин та порушення регуляції тонусу судин ступні. При цьому відбувається активація метаболічних шляхів, які регулюються такими білками як, індукуємий гіпоксією фактор 1 (HIF-1), що призводить до збільшення експресії проангіогенних факторів, таких як VEGF та факторів росту фібробластів [27].

Таким чином, хронічні діабетичні виразки важко підлягають загоєнню, а молекулярні механізми «хронізації» вивчені недостатньо. Розкриття молекулярних подій у хронічних діабетичних ранах, що не загоюються, дасть змогу допомогти клініцистам поліпшити прогностичні показники і кращі терапевтичні засоби для правильного ведення виразки, досягнення найкращих результатів з погляду клінічного успіху та економічного ефекту.

На першому етапі дослідження нами було проведено порівняльний аналіз вмісту протеїнів-регуляторів ангіогенезу (HIF-1α, VEGF, ангіостатин) та активності ММР у тканині гострих ран за нормоглікемії та хронічних виразок у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.

У дослідженні брали участь 45 пацієнти із хронічними діабетичними ранами, що знаходилися на амбулаторному лікуванні у Центральній поліклініці МВС України за період з 2020 по 2023 роки (клінічна база кафедри хірургії №2 НМУ імені О.О. Богомольця). Усі пацієнти дали письмову згоду на участь у дослідженні та дозвіл на публікацію результатів досліджень. Усі процедури та протоколи дослідження, використані в даному дослідженні, були розглянуті та схвалені місцевим етичним комітетом, і автори дотримувалися всіх етичних рекомендацій. Дослідження відповідають принципам, викладеним в останній редакції Гельсінської декларації (2013).

Біопсії (100 ± 3 мг) були взяті із різних ділянок діабетичних виразок під час місцевого лікування ран (Рис. 1.).

Рис. 1 Хронічна гнійна рана стопи у пацієнта із цукровим діабетом

У вигляді контролю було взято 5 зразків біопсійного матеріалу з грануляційної тканини гострої рани на 3 добу після розкриття запального вогнища

Рівні регуляторних білків протеїнів-регуляторів репаративних процесів та загоєнням ран, таких як гіпоксія-індуцибельний фактор-1α, (HIF-1α), фактор росту ендотелію судин (VEGF) та ангіостатини вимірювали за допомогою вестерн блот аналізу. Зразки розділяли електрофоретично в 10% SDS-PAGE (100 мкг протеїну на доріжку). Протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани з розміром пор 0,45 ± 0,2 мкм (Amersham

Biosciences, Упсала, Швеція) за допомогою електроблоту. Мембрани блокували в 5% розчині знежиреного знежиреного молока (Apex™ Bioresearch Products, США) протягом 90 хв при 37°С. Після блокування блоти обробляли первинними антитілами проти β-актину як контроль навантаження загального протеїну (Invitrogen, США, № MA5-15739), HIF-1α (Sigma Aldrich, США, № HPA001275), VEGF (Invitrogen, США). , № MA5-12184), або ангіостатини (отримано, як описано раніше [109]) при 4°С протягом ночі. Мембрани промивали у фосфатно-сольовому буфері (pH 7,4), що містив 0,05% Triton X-100 (PBST), та інкубували з відповідними вторинними анти-видовими антитілами, кон'югованими з пероксидизою хрону (HRP) (козячими анти-кролячими або антимишачими IgG, Invitrogen, США, кат.№ G-21234 і 31430 відповідно) протягом 90 хв. при 37 °С. Після промивання в PBST мембрани інкубували з субстратом HRP і експонували на рентгенівській плівці (Konica Minolta, Японія) за допомогою технології посиленої хемілюмінесценції (ECL). Сигнали візуалізували, оцифровували та аналізували за допомогою програмного забезпечення TL120 (TotalLab Ltd., США). Молекулярні маси визначали за допомогою стандартних забарвлених трансблот-маркерів (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Німеччина). Рівні протеїнів виражали в умовних одиницях (у.о.) після нормалізації за вмістом β-актину в кожній пробі.

Активність ММР-9 в біоптатах ранової поверхні шкіри оцінювали за допомогою желатинової зимографії і порівнювали її з активністю ММР-9 у біоптатах з гострих ран. Желатинолітичну активність аналізували шляхом розділення протеїнів (50 мкг/доріжку) у 8% поліакриламіді, кополімеризованому з желатином (5 мг/мл). Після денатуруючого електрофорезу гелі промивали двічі протягом 30 хв. у холодному 2,5 % (v/v) Triton X-100 для видалення SDS, а потім 5 разів протягом 5 хв. у холодній бідистильованій воді. Після промивання гелі інкубували протягом 16 год. при 37 °С у буфері для проявлення (50 мМ трис-HCl, pH 7,6, що містить 0,15 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $ZnCl_2$ і 0,02 % Tween-20). Зимограми фарбували

0,15% спиртовому розчині Coomassie R-250. Знебарвлення проводили у розчині 30 % метанолу та 10 % оцтової кислоти, що не містив барвника. Після знебарвлення гель мав рівномірний блакитний фон, за винятком тих зон, до яких мігрували ММР та розщеплювали субстрат. Желатинолітичну активність ідентифікували як прозорі смуги на фоні желатину, забарвленого кумасі. Отримані смуги ММП візуалізували та проводили кількісний денситометричний аналіз.

При статистічній обробці для аналізу даних вестерн-блотів і зимографії використовувався критерій У Манна-Уїтні для оцінки відмінностей між середніми параметрами. Усі змінні були виражені як середнє ± стандартна помилка середнього (S.E.M.). Для всіх тестів $P < 0,05$ вважалося статистично значущим. Для виконання всіх статистичних розрахунків використовувалося програмне забезпечення «OriginPro» (основна версія 9.0 SR2 Pro English).

Щоб дослідити вірогідні молекулярні механізми загоєння ран, ключові маркери гіпоксії та ангіогенезу були кількісно визначені в біоптатах діабетичних ранах та гострих ранах нормальних тканин. Показано, що експресія центрального регулятора гіпоксій-асоційованих процесів HIF-1α в діабетичних ранах була підвищена у 4,4 раза порівняно з значеннями в гострих ранах ($P<0,01$) (рис. 2).

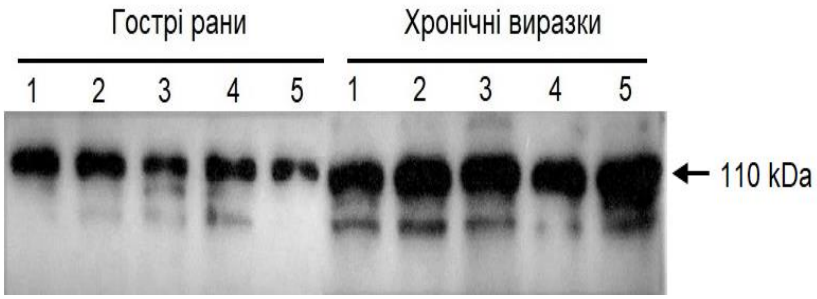


Рис. 2 Типова блотограма HIF-1α у біоптатах шкіри з гострих ран за нормоглікемії та хронічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом

Отримані дані свідчать за те, що у діабетичних ранах має місце значна тканинна ішемія.

Вестерн-блот VEGF зі зразків нормальної та виразкової тканин демонструють слідові кількості цього фактору росту у випадку діабетичної рани (рис. 3).

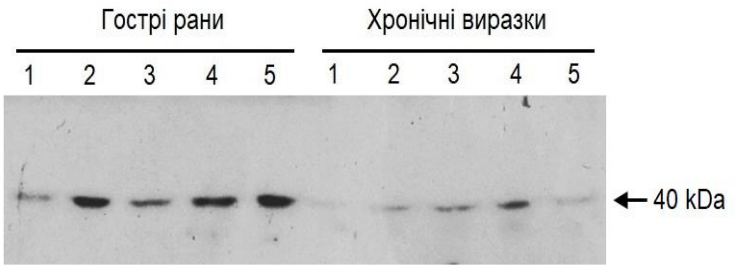
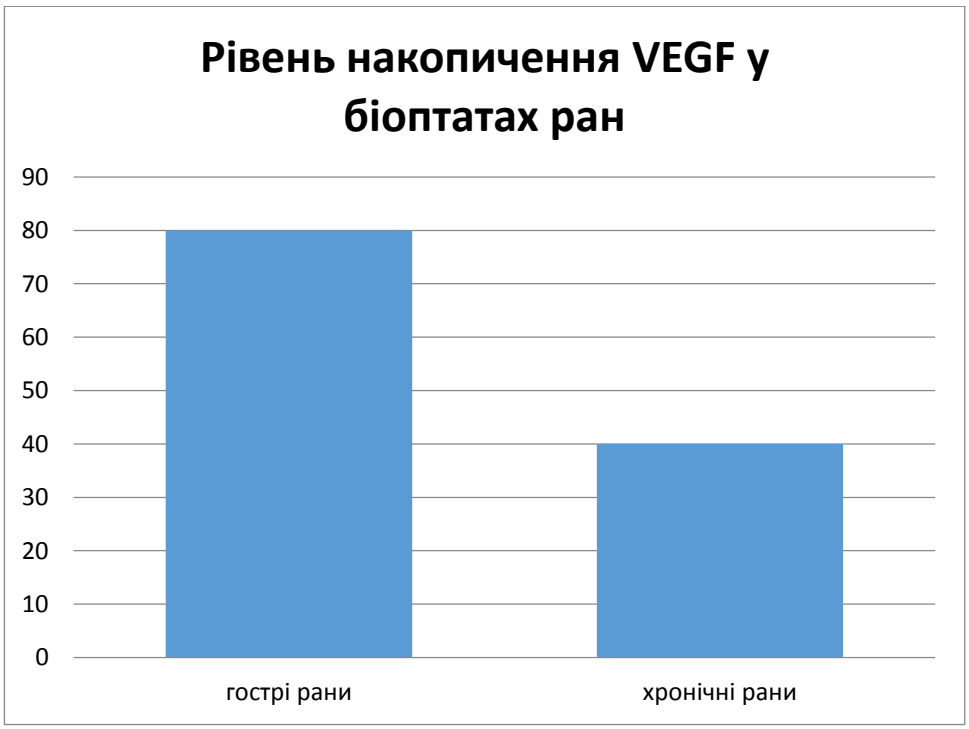


Рис. 3 Типова блотограма VEGF у біоптатах шкіри з гострих ран за нормоглікемії та хронічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом



Рівень експресії VEGF у гострих ранах у 2 рази вище ніж у діабетичних ранах (P<0,05).

Експресія регуляторів, що протидіють ангіогенезу та VEGF зміщує ангіогенний баланс у бік стану ішемії. Показано, що поліпептиди ангіостатину представлені у вигляді набору смуг 50, 45 і 38 кДа, які відповідають ізоформам К1-4,5, К1-4 і К1-3. Загальний вміст ангіостатину у діабетичних хронічних ранах перевищував у 2,5 рази порівняно із гострими ранами (P<0,05). Ці результати означають, що ангіогенна відповідь через підвищення регуляції утворення ангіостатину призводить до зниження експресії VEGF у тканинах (рис. 4).

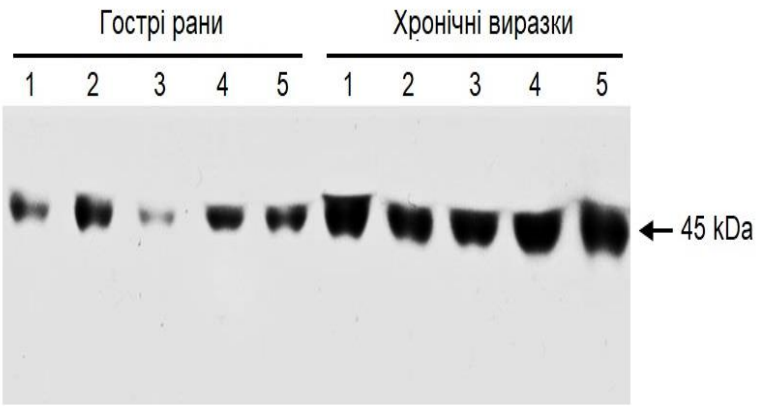
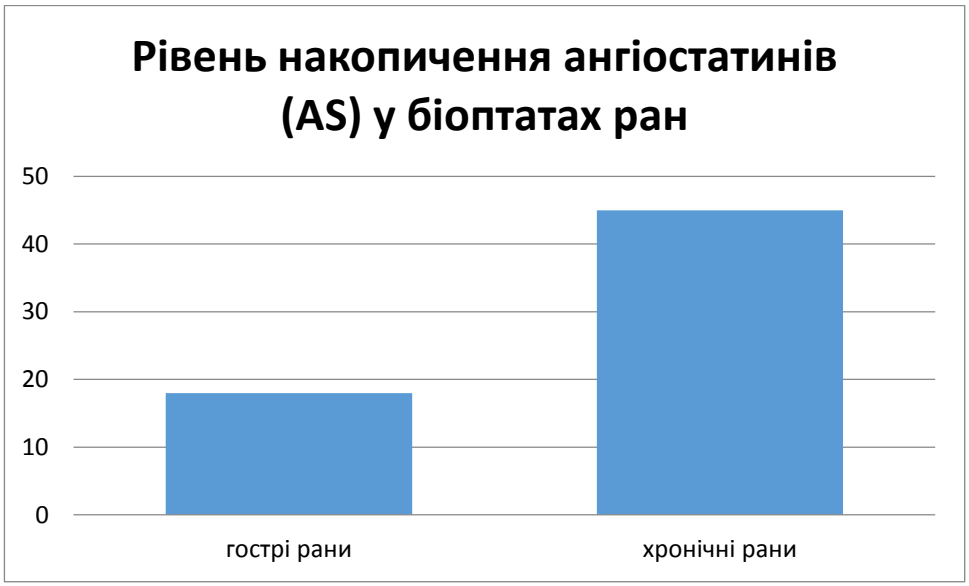


Рис. 4 Типова блотограма визначення ангіостатинів (AS) у біоптатах шкіри з гострих ран за нормоглікемії та хронічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом



У хронічних ранах, які важко загоюються, надекспресія ММР сприяє патофізіології порушень загоєння[154]. Як показано у попередніх дослідженнях, колагенолітична активність ММР залишається постійно високою в біоптатах і рідинах із незагойних ран, включаючи діабетичні виразки та синдром Марторелла [144]. У цьому дослідженні нами проведено порівняння активності ММР у осіб з гострими (операційними) ранами та трофічними виразками стоп у хворих на цукровий діабет. Желатинова зимографія показала, що гострі рани містять слідові кількості активної ізоформи ММР-9, тоді як рясність активності ММР-9 визначена в діабетичних виразках (рис. 5).

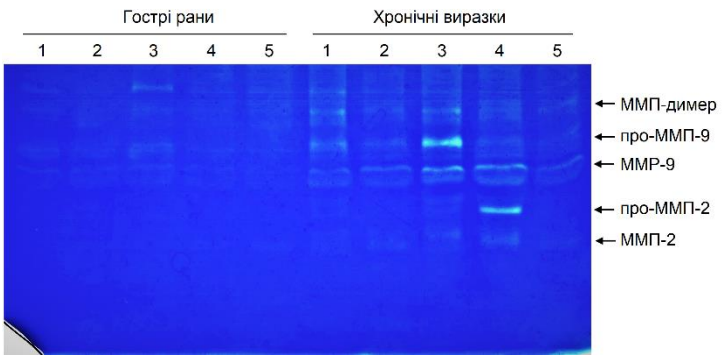


Рис. 5 Репрезентативна желатинова зимографія матриксних металопротеїназ біоптатів шкіри гострих ран за нормоглікемії та хронічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом

З даних рис. 5 можна припустити, що надмірна активність ММР-9 сприяє порушенням загоєння ран і хронізації процесу загоєння.

Хронічні діабетичні рани займають суттєву нішу в статистиці захворювань населення земної кулі, та з огляду на тенденцію старіння населення кількість цих хворих збільшиться . Тому оцінка та лікування ран у хворих на цукровий діабет стали актуальною проблемою [8].

Тому було життєво важливо виявити, принаймні частково, молекулярні механізми, що лежать в основі хронізації ранового процесу з метою покращення загоєння виразки стопи у пацієнтів з діабетом у клінічних умовах. Такі зусилля ґрунтувалися на кількісному визначенні кількох пов'язаних із загоєнням біомаркерів, що відображають основні моделі відновлення ран, такі як гіпоксія, ангіогенез і аутофагія. Відомо, що на першому етапі загоєння ранові ділянки знаходяться в стані гіпоксії, що розвивається внаслідок порушення місцевої судинної мережі та утворення фібринових відкладень, які покривають рану. На відміну від гострої гіпоксії, яка сприяє проліферації клітин і формує повністю функціональну судинну мережу для забезпечення адекватного постачання киснем, таким чином полегшуючи відновлення тканин, хронічна гіпоксія може викликати тривале запалення, глибокий розрив судин, посилення коагуляції, порушення повторної епітелізації та некроз, що призводить до сповільненого загоєння [17,193]. Тканинна гіпоксія індукує стійке підвищення експресії HIF-1α, який вважається центральним регулятором метаболізму кисню та маркером тяжкості гіпоксії. HIF-1α є фактором транскрипції, який посилює експресію багатьох генів, відповідальних за виживання клітин і правильний процес відновлення ран [197]. Є значні докази того, що передача сигналів HIF-1α

порушується при захворюваннях, які характеризуються розвитком хронічних ран, таких як цукровий діабет [201].

Крім того, надекспресія HIF-1 корелює з посиленою експресією профіброзних факторів і надмірною фіброгенною відповіддю, що призводить до розвитку келоїдних і гіпертрофічних рубців [150].

У гострих шкірних ранах гіпоксія стимулює утворення нових кровеносних судин на базі раніше існуючих. Цей процес, відомий як ангіогенез, вважається одним із ключових елементів загоєння ран [149].

Ангіогенез - це жорстко регульований баланс між активуючими факторами росту та інгібіторами [45,71,90,149,176, 214]. Серед інших генів регуляторних шляхів, індукованих гіпоксією, експресія HIF-1α запускає продукцію VEGF, потужного проангіогенного фактора. VEGF відповідає за неоваскуляризацію та ремоделювання судин для забезпечення реоксигенації пошкодженої тканини, тоді як нездатність рани активувати VEGF призводить до погіршення загоєння ран [14,27]. До певної міри несподівано ми показали зворотну кореляцію між рівнями HIF-1α та VEGF у дермальних біоптатах, зібраних із хронічних уражень шкіри. Це спостереження можна пояснити тим фактом, що синтез VEGF відбувається залежним від часу способом після активації керованого гіпоксією сигнального каскаду.

З іншого боку, затримка експресії VEGF в пошкодженій тканині може бути результатом множинних інгібіторних ефектів ангіостатинів, які, як повідомлялося, є потужними супресорами ангіогенезу через інгібування експресії VEGF і протидію передачі сигналів VEGF [28]. Ангіостатини є протеолітично отриманими фрагментами Pg/Pm, що містять різну кількість кринглових (K) доменів білків-попередників. Спочатку ангіостатини досліджувалися як пухлинно-асоційовані ангіоінгібітори, які пригнічують спричинену пухлиною неоваскуляризацію та обмежують утворення метастазів шляхом індукції апоптозу в ендотеліоцитах і зниження їх міграційної активності [27,70].

Однак нещодавно було показано, що ексудати з ішемічних виразок стопи сильно пригнічують проліферацію ендотеліальних клітин і утворення капілярних трубок завдяки антиангіогенним ефектам ангіостатинів, які локально виробляються в пошкодженій шкірній тканині [58, 172,180]. S.L. Drinkwater et al. (2002) продемонстрували, що фрагменти Pg сприяють недостатній неоваскуляризації та уповільненому загоєнню ран навіть за наявності підвищених рівнів VEGF та інших активаторів ангіогенезу [45].

В дослідженні продемонстровано, що біоптати з хронічних діабетичних ран містять велику кількість ізоформ ангіостатину, і це узгоджується з нашим попередніми дослідженнями, у якому виявилено масивне накопичення ангіостатину в пошкодженій дермі з хронічної рани пацієнта з гіпертонічною виразкою шкіри (синдром Марторелла) [144]. Рівні ангіостатину зазвичай корелюють з рівнями тканинних протеолітичних ферментів, головним чином активністю ММР, оскільки вони беруть участь у фрагментації Pg. ММР відомі як «скульптори ремоделювання тканин», які відіграють важливу роль у нормальному процесі загоєння, залучаючись до ремоделювання ECM та контролю активності, вивільнення та біодоступності цитокінів і факторів росту. Однак неконтрольоване та постійне посилення експресії ММР в ураженнях шкіри сприяє патофізіології порушень загоєння та розглядається як негативний прогноз для загоєння ран. Результати проведеного зимографічного аналізу схожі з результатами інших досліджень [57,61,116,139], які підтверджують цю класичну точку зору. Нами продемонстровано, що зразки з гострих ран містили дуже низькі рівні активного ММР-9 порівняно з аналогами з хронічних виразок стопи.

В даному дослідженні нами виявлено підвищені рівні ангіостатичних білків, факторів гіпоксії та гіперактивацію желатиназ, що загалом можуть сприяти невдалому загоєнню ран у пацієнтів із діабетичними ранами як наслідок гіпоксії тканин та гіперглікемії. Тестування профілю ангіогенних регуляторів і протеолітичної активності в комплексі з всебічною клінічною картиною може допомогти вибрати конкретний і правильний протокол для

лікування діабетичних ран, лікування, яке може включати хірургічну або вакуум-асистовану дебридментацію і використання інгібіторів протеїназ.

Оцінка активності ММР рекомендована для вибору правильної стратегії хірургічного та дермапластичного втручання під час виразки, оскільки високий рівень ММР може призвести до руйнування дермального трансплантата.

РОЗДІЛ 4
ЗАСТОСУВАННЯ АВТОЛОГІЧНОГО ПЛАЗМІНОГЕНУ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНИХ ДІАБЕТИЧНИХ РАН

Хронічні рани є однією з найсерйозніших проблем зі здоров'ям у всьому світі. Більшість шкірних ран, пов’язаних із діабетом, переходять у хронічну форму, особливо на нижніх кінцівках. Синдром діабетичної стопи, або діабетична виразка стопи, вважається одним із найнебезпечніших ускладнень цукрового діабету, що призводить до 84% ампутацій стоп [7,111,127]. Проблеми лікування діабетичної стопи пов'язані зі складністю основних патологічних процесів, які залишаються недостатньо вивченими. В останні роки відновився інтерес до розуміння порушення загоєння хронічних ран та їх лікування. Існує прогрес у тестуванні та застосуванні нових молекулярних і клітинних методів лікування хронічних ран на основі тканинної інженерії, стовбурових клітин, факторів росту, ферментів або їх інгібіторів [43,187]. Однак найбільш ефективне лікування хронічних діабетичних ран залишається невизначеним, незважаючи на деякі досягнення.

Загоєння ран є дуже складним біологічним процесом, що включає високоорганізовану послідовність чотирьох пересічних фаз (гемостаз, запалення, клітинна проліферація/міграція та ремоделювання тканин), які синхронізовані просторово та в часі. На відміну від гострих ран, загоєння хронічних уражень шкіри зупиняється на одному з цих етапів, зазвичай у фазі запалення [41,50,125]. Протеази необхідні для кожної фази загоєння ран, відіграючи особливу роль у деградації позаклітинного матриксу (ECM), ремоделюванні тканин, міграції клітин і запаленні. Будь-які порушення функціонування протеолітичної системи в пошкодженій шкірній тканині можуть призвести до порушення загоєння дермальних ран [21,119, 154,198,]. Наприклад, надмірне виробництво та гіперактивність матриксних металопротеаз (MMP) спостерігаються у багатьох випадках невдалого

загоєння ран. Тому очікується розробка підходів до модуляції протеолітичної активності для лікування ран, що важко загоюються.

Сучасні дані визначили плазміноген (Pg) як одного з ключових учасників процесу загоєння ран. Pg, глікопротеїн 92 кДа, виробляється в печінці та циркулює в плазмі (1,8–2,2 мкМ) як каталітично неактивний зимоген серинової протеази плазміну (Pm) (EC 3.4.21.7). Фізіологічно тканинні або урокіназні активатори Pg (tPA або uPA відповідно) перетворюють зимоген у Pm, протеазу широкої субстратної специфічності, яка є центральним ферментом фібринолітичної системи [82, 167]. Проте останні дослідження підкреслили важливість Pg/Pm в інших процесах, окрім гемостазу, таких як ремоделювання ECM, міграція та апоптоз клітин, запалення та ангіогенез [168,170,173,174]. Під час фізіологічного процесу загоєння ран Pg регулює як ініціацію, так і зникнення фази запалення та бере участь у ремоделюванні тканин, крім забезпечення кліренсу фібрину . На даний момент виявлено понад 12 різних клітинних рецепторів Pg, які потенційно пов'язані із загоєнням ран. Це означає, що окрім фібринолізу Pg може діяти як сигнальна молекула, яка регулює та координує активність моноцитів/макрофагів, кератиноцитів, тромбоцитів та інших клітин, які беруть участь у загоєнні ран. Щоб підкреслити особливу роль Pg у репаративних процесах, цей білок називають «головним регулятором» загоєння ран [55].

Було проведено численні дослідження на різних моделях тварин, які припускають, що Pg як місцеве, так і системне застосування є корисним для загоєння ран. Наприклад, Shen et al. [133] продемонстрували, що ін’єкції Pg мишам з опіковими шкірними ранами прискорюють процес загоєння гострих ран і значно покращують загоєння хронічних ран у мишей з гіперглікемією. Інше дослідження [55] показало, що місцеве введення Pg покращує загоєння ран, викликаних радіацією, шляхом перепрограмування експресії генів і модуляції транскриптома таким чином, щоб зменшити ризик фіброзу. Повідомлялося, що Pg-дефіцитні миші накопичують значні відкладення

фібрину та нейтрофілів у пораненій ділянці, що призводить до хронічного запалення, неправильного ремоделювання тканин та затримки формування грануляційної тканини [52]. Хоча переконливі докази необхідності Pg для успішного загоєння ран були значно накопичені під час численних досліджень на тваринах, інформація щодо Pg як потенційного препарату-кандидата для лікування ран у пацієнтів із поганим загоєнням, особливо в осіб, які страждають на діабетичні виразки стопи, є. все ще абсолютно не вистачає. Таким чином, для успішного перекладу доклінічних даних важливою є клінічна значущість вищезгаданих багатообіцяючих результатів. Щоб заповнити цю прогалину, ми організували дослідження, метою якого було вперше дослідити, чи може місцеве застосування аутологічного Pg, отриманого з плазми, покращити загоєння хронічних виразок стопи у пацієнтів із цукровим діабетом II типу. Щоб з'ясувати вірогідні молекулярні механізми, які лежать в основі впливу добавки Pg на загоєння ран, були виміряні рівні тканинної експресії ключових білкових маркерів основних фізіологічних моделей, тісно пов'язаних з регенерацією шкіри, таких як гіпоксія, ангіогенез і аутофагія.

Нативний Glu-Pg виділяли та очищали з 20-25 мл свіжої цитратної плазми пацієнта за допомогою афінної хроматографії на лізин-сефарозі (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Упсала, Швеція), як описано раніше [104,191]. Індивідуально приготовлений Pg мав 95-99% чистоту, як оцінювали SDS-PAGE (рис. 1). Виділений Pg не виявляв спонтанної протеолітичної активності, як оцінювали спектрофотометрично з використанням специфічного хромогенного субстрату S-2251. Pg розчиняли в стерильному забуференому фізіологічному розчині, зберігали при –20 oC і перед використанням доводили його концентрацію до 1,0 мг/мл.

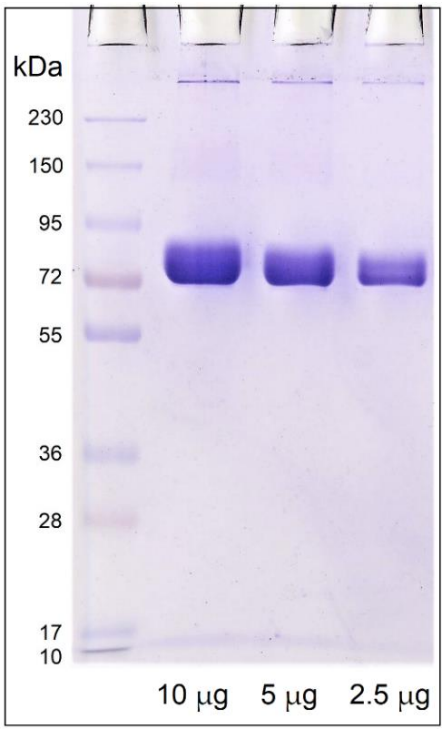


Рисунок 1. Електрофореграма SDS-PAGE плазміногену, виділеного з плазми пацієнта за допомогою афінної хроматографії на лізин-сефарозі.

В дослідженні брали участь 45 хворих на цукровий діабет 2 типу віком 48-81 рік із хронічними ранами нижніх кінцівок, які перебували на амбулаторному лікуванні в ЦП МВС України (м. Київ, Україна) протягом 2020-2023 рр. Усі рани носили хронічний характер, не загоювались принаймні за 6 тижнів до початку лікування. Кожну рану характеризували за шкалою PEDIS [30]. Усі рани, взяті для дослідження, були охарактеризовані як P1-2E3,3D1-2I1-2S2.

Пацієнти були випадковим чином розподілені на дві групи, суттєвих відмінностей у загальних демографічних і клінічних змінних між учасниками не було (табл. 1).

Демографічна та клінічна характеристика пацієнтів

Пацієнти	Параметри				
	N	Вік	Стать	Рівні глюкози крові, ммоль/л	Розміри рани, $см^2$
ГрупаI (досліджувана, Pg-ліковані)	20	64,5 ± 16,5	Чоловіки – 12 Жінки - 8	10.4 ± 0,2	7.7 ± 4,75
ГрупаII (контрольна)	25	62.5 ± 12,8	Чоловіки – 12 Жінки - 13	9.8 ± 0,4	8.5 ± 3,96

Місцеву обробку шкірних ран пацієнтам 2-ї групи проводили згідно зі стандартними протоколами, які передбачали застосування ранових покриттів (сорбуючі пов'язки, гідрогелеві пов'язки, покриття на основі вазеліну та парафіну), обробку ран натрію хлоридом 0,9%, використовували NPWT для зменшення площі рани терміном на 3 дні в перемінному режимі -125 мм рт.ст..). В досліджуваній групі (1 група), місцево наносили аутологічний Pg на ранову поверхню в дозі 1,0 мг/мл стерильного забуференого фізіологічного розчину кожні 2 дні протягом 20 днів (загалом 10 аплікацій). Протягом усього періоду лікування всі хворі отримували цукрознижувальні препарати.

Зразки тканин із гострих ран (n = 5) відбирали у пацієнтів без цукрового діабету після пластичних операцій, а потім використовували в дослідженні з оцінки активності MMP.

Для вимірювання площі рани та оцінки терапії використовували цифрову планіметрію, за допомогою програми Imito Wound 2.0.0.17 (ImitoAG, Німеччина, https://imito. io/en/imitowound). Розмір рани виражали в

см^2. Швидкість закриття рани як зміни відносних розмірів рани розраховували за такою формулою:

Relative wound size (%) = (original wound area – wound area remaining)/original wound area × 100% [18]

Відносний розмір рани (%) = (початкова площа рани – залишкова площа рани)/початкова площа рани × 100% [18]

Шкірні біоптати з ложа рани відбирали у пацієнтів з цукровим діабетом перед першим застосуванням Pg (0 день) і на 18-й день поточного періоду лікування. Кожен зразок тканини складався з шарів шкіри cutis і subcutis. Відразу після збору всі біоптати зберігали при –80^o С до аналізу. Зразки тканини для вестерн-блотів готували шляхом подрібнення в рідкому азоті та гомогенізації в крижаному 50 мМ трис-HCl буфері (pH 7,4), додатково містив 150 мМ NaCl, 0,1% SDS, 1,0% Triton X-100 і доповнюється сумішшю інгібіторів протеаз/фосфатаз. Білкові екстракти для аналізу ММР готували з використанням того ж лізованого буфера, який не містив інгібіторів ферментів. Співвідношення тканина/буфер приймали рівним 1:5 (м/об). Після етапів гомогенізації зразки обробляли ультразвуком протягом 60 секунд за допомогою ультразвукового дезінтегратора Sartorius (Labsonic® M, Геттінген, Німеччина) і центрифугували при 16 000 g протягом 45 хвилин при 4 оС. Концентрацію загального білка в кожному супернатанті визначали спектрофотометрично за методом Стошека [139]. Зразки розводили 1:1 у буфері Laemmli Sample Buffer, заморожували та зберігали при –80 оС перед аналізом.2.5. Western blot analysis.

Рівні регуляторних білків, пов’язаних з репаративними процесами та загоєнням ран, таких як фактор-1α, індукований гіпоксією (HIF-1α), фактор росту ендотелію судин (VEGF), ангіостатини та маркер аутофагії LC3, вимірювали за допомогою вестерн-блоттингу. Зразки розділяли електрофоретично в 10% SDS-PAGE (100 мкг білка на доріжку). Білки переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани з розміром пор 0,45 ± 0,2 мкм (Amersham Biosciences, Упсала, Швеція) за допомогою електроблоту.

Мембрани блокували в 5% розчині знежиреного знежиреного молока (ApexTM Bioresearch Products, США) протягом 90 хв при 37 оС. Після блокування блоти досліджували первинними антитілами проти β-актину як контролем навантаження (Invitrogen, США, № MA5-15739), HIF-1α (Sigma Aldrich, США, № HPA001275), VEGF (Invitrogen, США). , № MA5-12184), LC3 (Sigma Aldrich, США, № L8918) або ангіостатини (вироблені, як описано в іншому місці [18]) при 4°C протягом ночі. Мембрани промивали у фосфатно-сольовому буфері (pH 7,4), що містив 0,05% Triton X-100 (PBST), та інкубували з відповідними анти-видовими антитілами, кон'югованими з вторинною пероксидизою хрону (HRP) (козячими анти-кролячими або антимишачими). IgG, Invitrogen, США, кат.№ G-21234 і 31430 відповідно) протягом 90 хв при 37 оС. Після промивання в PBST мембрани інкубували з субстратом HRP і експонували на рентгенівській плівці (Konica Minolta, Японія) за допомогою технології посиленої хемілюмінесценції (ECL). Сигнали візуалізували, оцифровували та аналізували за допомогою програмного забезпечення TL120 (TotalLab Ltd., США). Молекулярні маси визначали за допомогою стандартних попередньо пофарбованих трансблот-маркерів молекулярної маси (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Німеччина). Рівні білка виражали в довільних одиницях після корекції на β-актин.

Активність MMP-9 оцінювали за допомогою желатинової зимографії в біоптатах з уражень шкіри, щоб оцінити ефекти лікування Pg діабетичних ран і порівнювали її з активністю MMP-9 у біоптатах з гострих ран. Желатинолітичну активність аналізували шляхом розділення білків (50 мкг/доріжку) у 8% поліакриламіді, кополімеризованому з желатином (5 мг/мл), як описано раніше [139]. Коротко кажучи, після денатуруючого електрофорезу гелі промивали двічі протягом 30 хвилин у холодному 2,5 % (об'єм/об'єм) Triton X-100 для видалення SDS, а потім 5 разів протягом 5 хвилин у холодній бідистильованій воді. Після промивання гелі інкубували протягом ночі при 37 оС у буфері для проявлення (50 мМ трис-HCl, pH 7,6, що містить 0,15 М NaCl, 5 мМ CaCl2, 1 мМ ZnCl2 і 0,02 % Tween-20.

Зимограми фарбували 0,15 % кумасі. Розчин Brilliant Blue R-250 (Merck Millipore, Німеччина) у 30 % метанолі та 10 % оцтової кислоти та знебарвлення у тому самому розчині без кумасі синього Кінцевий гель мав рівномірний блакитний фон, за винятком тих областей, до яких мігрували та розщеплювалися ММР. Желатинолітичну активність ідентифікували як прозорі смуги на фоні желатину, забарвленого кумасі синім.Отримані смуги ММР візуалізували та кількісно визначали денситометрично.

Криві Каплана-Мейєра були побудовані для всіх пацієнтів, які отримували лікування на основі Pg, і для тих, хто отримував стандартне лікування, використовуючи статистику Вілкоксона для перевірки суттєвої різниці між групами.

Для аналізу даних вестерн-блотів і зимографії використовувався критерій У Манна-Уїтні для оцінки відмінностей між середніми параметрами. Усі змінні були виражені як середнє ± стандартна помилка середнього (S.E.M.). Для всіх тестів $P<0,05$ вважалося статистично значущим. Для виконання всіх статистичних розрахунків використовувалося програмне забезпечення «OriginPro» (основна версія 9.0 SR2 Pro English).

На початку лікування нами було проведено оцінка ранової поверхні у пацієнтів із діабетичними ранами. Як правило, у хронічних діабетичних виразках повністю була відсутня грануляційна тканина. Ранова поверхня бліда, гладка, відшліфована перев’язками, виділення серозні без запаху. Крайова епітелізація відсутня. Краї рани нерівні, підсушені у вигляді струпа, в деяких випадках мацеровані. Навколішні тканини незмінені або бліді та набряклі. Дно хронічної рани залежить від отриманого напередодні пацієнтом місцевого лікування. Після проведених лікувальних заходів (в групу дослідження попадали пацієнти після проведених неодноразово курсів місцевого лікування) ранові поверхні були чисті, некротичних тканин не відмічалось. Залишки фібринового нашарування розташовавались нерівномірно по поверхні рани.

На першу аплікацію автологічного плазміногену ранова поверхня хронічних ран не реагувала. Ніяких об'єктивних змін, суб'єктивних відчуттів пацієнтами не було відмічено.

Після повторного застосування Pg стан ранової поверхні та клінічні прояви експериментального лікування зазнавали певних змін. При надходженні больовий синдром у пацієнтів становив у середньому 2,43±0,12 бала. Після лікування у хворих з'явився біль у ділянці ранової поверхні. Протягом наступних трьох діб больовий синдром наростав до 4,83±0,20 бала. У подальшому, починаючи з 8-го дня лікування, пацієнти відчували значно менше болю. Після третьої аплікації Pg об'єктивно відзначалися перифокальна гіперемія та набряк. Ранова поверхня почервоніла з вираженою ексудацією. Локально температура тканин підвищувалась на 1-2^0С. У 3 хворих на шкірі навколо рани спостерігались дрібні петехіальні висипання. У всіх пацієнтів основної групи краї рани визначились протягом першого тижня лікування. Усі ці клінічні симптоми вказують на те, що місцевий Pg індукує стадію гострого запалення через подолання фази хронічного запалення, таким чином підштовхуючи рану до загоєння.

З 6-го дня лікування самопочуття хворих значно покращилося. Зменшилися набряк і гіперемія, рани очистилися від відкладень фібрину, зменшилася ексудація. Пацієнти відзначали відсутність больового синдрому і без скарг переносили подальше лікування. На 12–14-ту добу лікування місцевим Pg рани повністю очищалися. Відзначено повну відсутність фібрину та появу дрібнозернистої грануляційної тканини. Утворення грануляційної тканини на поверхні рани є необхідною умовою для повторної епітелізації, оскільки це забезпечує міграцію епітеліальних клітин і закриття рани. Ексудація мізерна з серозним вмістом без запаху. На 16 добу задокументовано появу крайової епітелізації та зменшення площі ранової поверхні. На 21–24 добу рани повністю закривались без ознак патологічного рубцювання.

Фотоколаж, зображений на рис. 2, демонструє динаміку загоєння ран під час місцевого лікування Pg.

Рис. 2. Динаміка клінічних змін та загоєння діабетичної хронічної виразки стопи при застосуванні аутологічного плазміногену

Рис. 2. Динаміка клінічних змін та загоєння діабетичної хронічної виразки стопи при застосуванні аутологічного плазміногену

Разом з тим, у пацієнтів контрольної групи загоювались поступово вторинним натягом під дією місцевого лікування та загальноклінічних заходів.

Фотоколаж, зображений на рис. 3, демонструє динаміку загоєння ран під час місцевого лікування традиційними засобами.

Рис. 3. Динаміка клінічних змін та загоєння діабетичної хронічної виразки стопи при місцевому лікування традиційними заходами.

У середньому повне закриття необроблених Pg ран (контрольна група) досягалося протягом 120 ± 17 днів, тоді як закриття рани після місцевого застосування Pg спостерігалося через 24 ± 4 дні ($P<0,01$).

Постійний моніторинг розміру рани за допомогою цифрової планіметрії виявив, що місцеве лікування Pg покращує загоєння та значно прискорює швидкість загоєння рани порівняно з пацієнтами, які отримували лікування за стандартизованими протоколами (рис. 3)

.

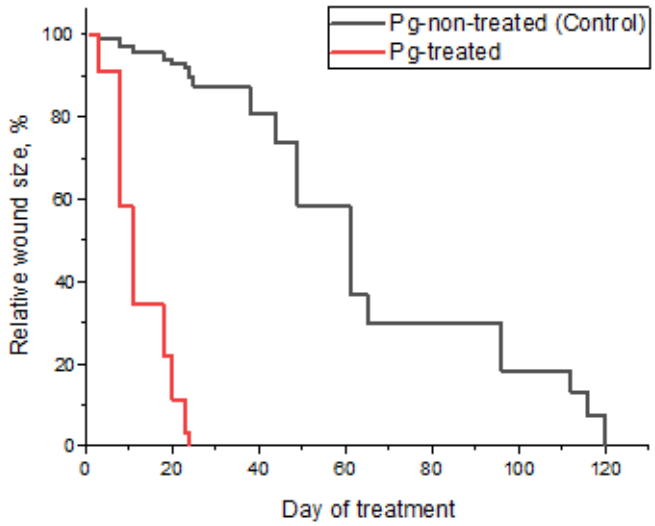


Рис. 4. Криві загоєння Каплана-Мейєра, що відображають середню швидкість закриття рани. Значна різниця спостерігалася між групами, які отримували плазміноген, і контрольною групою (Wilcoxon, P = 0,0046).

.

Щоб дослідити вірогідні молекулярні механізми Pg-індукованих переваг у загоєнні ран, ключові маркери гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії були кількісно визначені в біоптатах дермальних уражень до та на 18-й день експериментального лікування. Типові блотограми, що демонструють зміни рівнів HIF-1α, VEGF, ангіостатинів і LC3, зображені на рис. 5A, тоді як результати денситометричного аналізу представлені на рис. 5B. Показано, що застосування Pg знижувало експресію центрального регулятора гіпоксій-асоційованих процесів HIF-1α у 6,3 раза порівняно з вихідним значенням ($P<0,01$). Отримані дані свідчать за те, що застосування Pg запобігає прогресуючій ішемії шкіри.

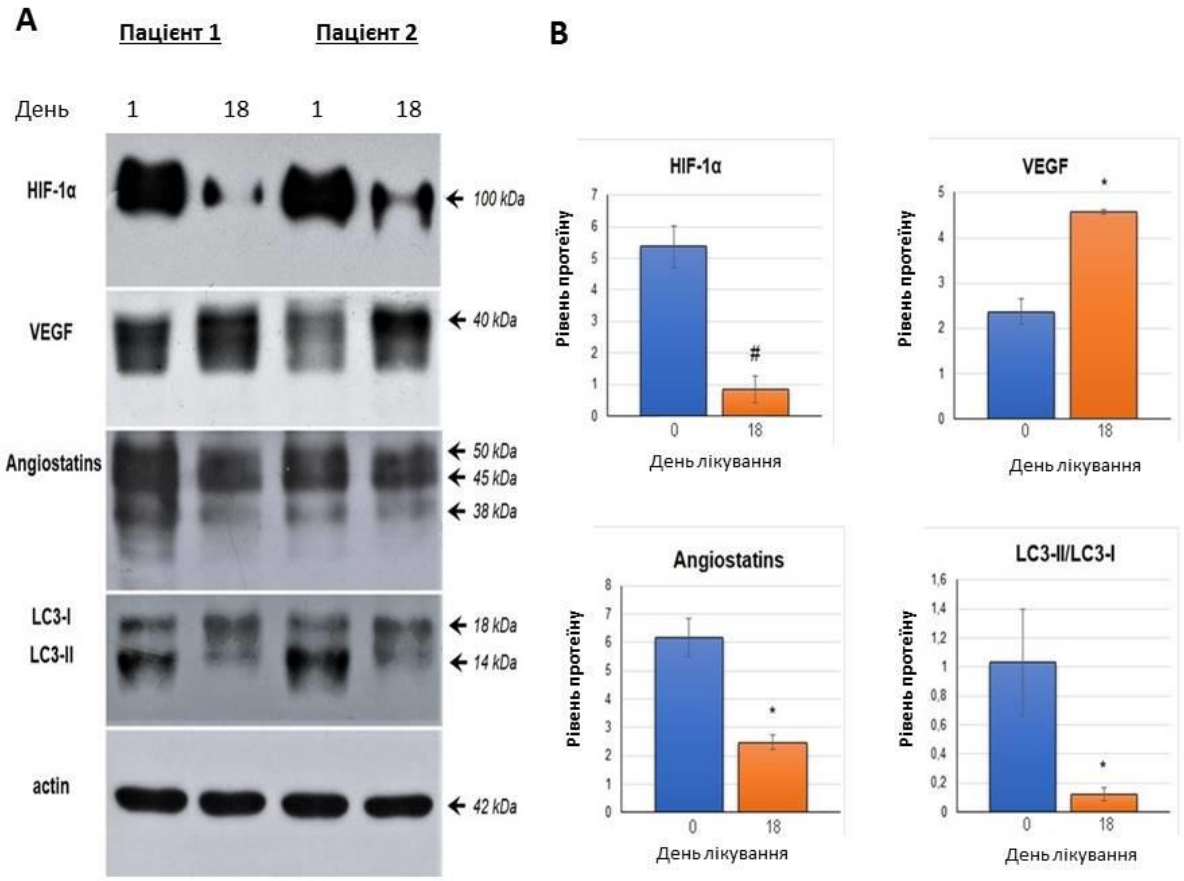


Рис. 5. Зміни рівнів регуляторних білків у ранових дермальних біоптатах під час місцевого застосування плазміногену: А – репрезентативні блотограми, В – результати імуноблот денситометричного аналізу (* - P<0.05; # - P<0.01, U Mann-Whitney test).

Лікування на основі Pg впливало на експресію регуляторів, що протидіють ангіогенезу, ангіостатину та VEGF, таким чином зміщуючи ангіогенний баланс у бік стану активації. Показано, що поліпептиди ангіостатину представлені у вигляді набору смуг 50, 45 і 38 кДа, які відповідають ізоформам К1-4,5, К1-4 і К1-3. Лікування Pg зменшувало загальний вміст ангіостатину на 18-й день у 2,5 раза порівняно з вихідним рівнем (P<0,05), водночас збільшуючи експресію VEGF у біоптатах рани в 1,9 раза (P<0,05). Ці результати означають, що Pg сприяє ангіогенній

відповіді через зниження регуляції утворення ангіостатину та підвищення експресії VEGF у тканинах.

Результати кількісного аналізу білка LC3, пов'язаного з аутофагією, у дермальних біоптатах демонструють, що додавання Pg призвело до зниження співвідношення LC3-II/LC3-I на 18-й день лікування (у 8,6 разів, $P<0,05$). Цей результат свідчить про те, що використання Pg як варіанту лікування діабетичних хронічних виразок зменшує потік аутофагії, таким чином захищаючи тканини від аутофагічної загибелі клітин.

Надекспресія ММР в хронічних ранах призводить до патофізіологічних процесів, які унеможливлюють фізіологіне загоєння [57,61,99,116,154,189]. Раніше ми та інші автори показали, що колагенолітична активність ММР залишається постійно високою в біоптатах і рідинах із незагойних ран, включаючи діабетичні виразки та синдром Марторелла [144]. У цьому дослідженні ми порівнювали активність ММП у осіб з гострими (операційними) ранами та трофічними виразками стоп у хворих на діабет, які отримували Pg. Желатинова зимографія показала, що гострі рани містять слідові кількості активної ізоформи ММР-9, тоді як рясність активності ММР-9 визначена в діабетичних виразках (рис. 6). Можна припустити, що надмірна активність ММР-9 може сприяти порушенням загоєння ран і хронізації процесу загоєння. Ми показали, що лікування рани з використанням Pg знижувало активність ММР-9 у 3,5 раза на 18-ту добу лікування порівняно з вихідним значенням ($P<0,01$). Це означає, що ремоделювання тканини майже завершено, і висока активність ММП більше не потрібна.

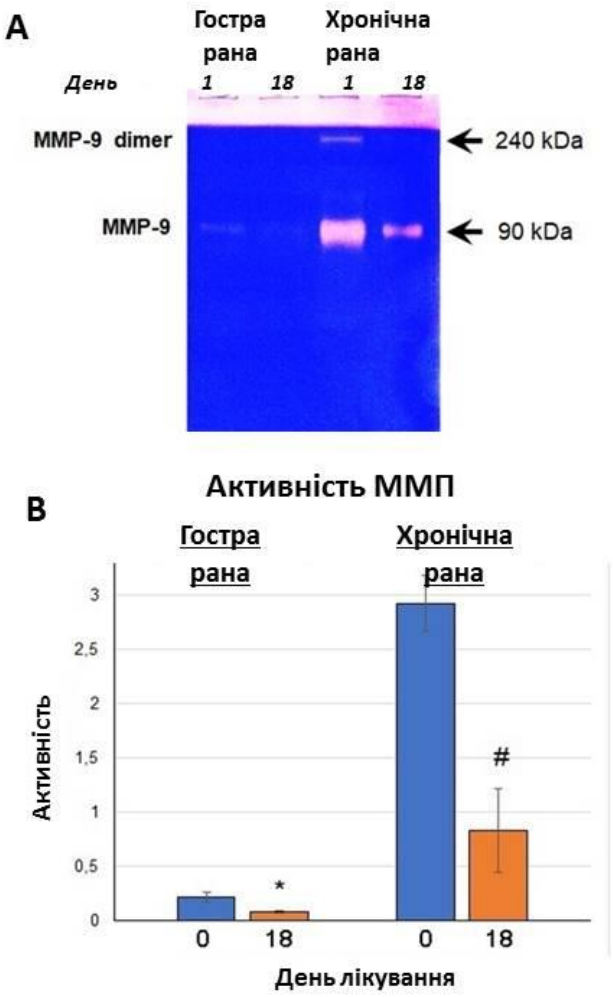


Рис. 6. Оцінка активності матриксних металопротеаз (MMP assay) у тканинних біоптатах, отриманих із гострих (операційних) ран і діабетичних виразок стопи, оброблених місцевим застосуванням плазміногену: А – типова желатинова зимографія матриксних металопротеаз; В – результати денситометричного аналізу зимограми (* - P<0,05; # - P<0,01, U критерій Манна-Уітні).

Діабетичні виразки шкіри є справжньою «тихою епідемією» серед населення світу. Хронічні діабетичні рани мають значний соціальний і фінансовий вплив і впливають на якість життя мільйонів людей, тому оцінка та лікування ран у хворих на цукровий діабет стали актуальною проблемою [34]. Дане пілотне дослідження є першим клінічним дослідженням, яке

демонструє, що місцеве застосування Pg забезпечує швидке та успішне загоєння ран у хворих на цукровий діабет із хронічними виразками стопи, для яких сучасні засоби захисту обмежені або взагалі відсутні.

Серед великої кількості білків, які беруть участь у загоєнні ран, Pg відіграє багатогранну роль у процесах загоєння. Наразі було підкреслено, що фізіологічне значення Pg у загоєнні ран не обмежується його перетворенням на Pm і виходить далеко за межі його фібринолітичної функції [133]. Зв'язування Pg з його клітинними рецепторами сприяє міграції моноцитів, відповідям макрофагів під час запалення, ангіогенезу та загоєнню ран. Pg транспортується до місця пошкодження, зв'язуючись із макрофагами та нейтрофілами, де концентрація Pg локально підвищується, що призводить до прискореного загоєння ран [183]. У свою чергу Pg стимулює макрофаги до переходу фенотипу M1. Це важлива подія з точки зору загоєння ран, тому що занадто слабке запалення може призвести до незагоєння тканин [110]. Таким чином, Pg стимулює макрофаги долати хронічне запалення та індукувати гострий процес, щоб підштовхнути рану до загоєння. Окрім своєї ролі в активації запалення, Pg також має вирішальне значення для наступних етапів, включаючи завершення запалення та активацію фази проліферації, діючи як хемоатрактант для клітин, які беруть участь у загоєнні хронічної рани [81].

Кілька доказів вказують на те, що дефіцит або функціональна недостатність Pg або його фізіологічних активаторів може спричинити затримку загоєння. Під час загоєння хронічної рани кератиноцити переднього краю міграції експресують uPA та його рецептор (uPAR). Pg-дефіцитні миші показали виражену затримку загоєння ран, пов'язану зі зниженою швидкістю міграції кератиноцитів від країв рани та зниженою здатністю цих клітин протеолітично торувати свій шлях через ECM [81]. Раніше [52] було показано, що загоєння ран на шкірі порушується у Pg-дефіцитних мишей. Порушення загоєння у Pg-дефіцитних мишей викликано не тільки недостатнім фібринолізом, але також порушенням сигналізації прозапальних клітин і кератиноцитів, таким чином перериваючи реепітелізацію. Крім того,

системне лікування нейтралізуючим моноклональним антитілом проти uPA затримує загоєння ран у tPA-дефіцитних мишей, подібно до того, що показано у Pg-дефіцитних мишей [21]. Дуже важливо відзначити, що діабет індукує кілька типів посттрансляційних модифікацій у молекулах Pg, які можуть сприяти його функціональним дисфункціям. Аджан та ін. [2] продемонстрували, що залишок Nε-фруктозил-лізину на Pg був однією з найпоширеніших модифікацій Pg при діабеті з переважним глікуванням залишків лізину 107 і 557, сайтів, залучених до зв'язування та розщеплення фібрину. Повідомлялося про глікацію Pg як у пацієнтів з цукровим діабетом 1-го, так і 2-го типу, що порушує фібриноліз через зниження генерації Pm, протеолітичної активності Pm і взаємодії Pg/Pm-фібрин [174]. Однак досі невідомо, чи структурні та функціональні аномалії Pg можуть бути залучені в патогенез хронічної рани при цукровому діабеті. Оскільки попередні дані, отримані в дослідженнях на тваринах, показали, що добавки Pg (місцевого або системного) покращують швидкість загоєння ран [55, 170, 144, 163], було б особливо важливо спостерігати, чи може застосування Pg, отриманого з плазми, прискорити швидкість закриття ран у людей з хронічними діабетичними дефектами шкіри. Таким чином, основна ідея нашого дослідження полягає в тому, що посилена місцева доставка Pg може подолати його функціональний дефіцит у ранах, що погано загоюються.

Крім того, було життєво важливо виявити, принаймні частково, молекулярні механізми, що лежать в основі виражених сприятливих ефектів Pg у покращенні загоєння виразки стопи у пацієнтів з діабетом у даних клінічних умовах. Такі зусилля ґрунтувалися на кількісному визначенні кількох пов'язаних із загоєнням біомаркерів, що відображають основні моделі відновлення ран, такі як гіпоксія, ангіогенез і аутофагія. На першому етапі загоєння ранові ділянки знаходяться в стадії гіпоксії, яка є результатом пошкодження місцевої судинної мережі, та утворення фібринових нашарувань[15]. Гіпоксія в гострих ранах стимулює проліферацію клітин і формування функціонуючої судинної мережі. Хронічна гіпоксія викликає

тривале запалення, глибокий розрив судин, посилення коагуляції, порушення повторної епітелізації та некроз, що призводить до сповільненого загоєння [76]. Тканинна гіпоксія індукує стійке підвищення експресії HIF-1α, який вважається центральним регулятором метаболізму кисню та маркером тяжкості гіпоксії. HIF-1α є фактором транскрипції, який посилює експресію багатьох генів, відповідальних за виживання клітин і правильний процес відновлення ран [24]. Як ми вже вказували, передача сигналів HIF-1 порушується при захворюваннях, які викликають утворення хронічних ран(ЦД) [150]. Відомо, що підвищена експресія HIF-1 корелює з надекспресією фіброзних факторів та надмірною фібриногенною відповіддю [44,71]. У цьому дослідженні ми показали, що Pg як місцеву добавку можна використовувати для запобігання прогресуючій шкірній ішемії та для маніпулювання експресією HIF-1α в патологічних діабетичних ураженнях шкіри, зменшуючи ризик утворення келоїдів.

Однією з ключових подій загоєння є проходження етапу ангіогенезуякий регулюється факторами росту та інгібіторами. У відповідь на гіпоксію наростає експресія HIF-1α, що в свою чергу запускає продукцію VEGF . VEGF відповідає за неоваскуляризацію та ремоделювання судин для забезпечення реоксигенації пошкодженої тканини, тоді як нездатність тканин активувати VEGF призводить до погіршення загоєння ран [70]. Виявлена нами зворотна кореляція між рівнями HIF-1α та VEGF в біоптатах хронічних ран може бути пояснена залежним в часі способом продукції VEGF. Також , ця залежність може бути спричинена інгібуванням VEGF ангіостатинами, які в хронічних ранах утворюються в надлишку в результаті протеолітичної фрагментації Pg\Pm на фоні гіперглікемії.

Дринкуотер та ін. [45] та інші автори [154,180] продемонстрували, що фрагменти Pg сприяють недостатній неоваскуляризації та уповільненому загоєнню ран навіть за наявності підвищених рівнів VEGF та інших активаторів ангіогенезу. Рівні ангіостатину зазвичай корелюють з рівнями тканинних протеолітичних ферментів, головним чином активністю MMP,

оскільки вони беруть участь у фрагментації Pg [99]. ММР залучаються до ремоделювання ECM та контролю активності, вивільнення та біодоступності цитокінів і факторів росту [57]. Але неконтрольоване та постійне посилення експресії ММР у ураженнях шкіри сприяє патофізіології порушень загоєння та розглядається як негативний прогноз для загоєння ран [222]. Ми показали, що зразки з гострих ран містили дуже низькі рівні активного ММР-9 порівняно з аналогами з хронічних виразок стопи, тоді як Pg покращував активність ММР під час лікування. Відомо, що аберантно індукований HIF-1α може безпосередньо посилювати експресію ММР [48]. Це означає, що чим глибше розвинувся стан гіпоксії в ураженні шкіри, тим більше буде активність ММП і рівень ангіостатину. Нами продемонстровано, що знижена експресія HIF-1α через аплікації Pg супроводжується зниженням активності ММР-9 і зниженим утворенням ангіостатину. Цей факт, принаймні частково, може пояснити, чому зниження рівня ангіостатину виявляється під час лікування на основі Pg, незважаючи на додаткову доставку молекули-попередника в область рани. Можна припустити, що зниження регуляції ангіостатину призводить до полегшення синтезу VEGF і покращення неоваскуляризації в місцях пошкодження. Крім того, Cheng et al. [28] виявили, що існує прямий зв'язок між передачею сигналу Pg і впливом на синтез VEGF. Взаємодія між епітеліальним тромбомодуліном і Pg посилює проліферацію кератиноцитів, посилює експресію VEGF і сприяє відновленню шкірних ран, порушених у середовищі з високим вмістом глюкози. У сукупності це може бути необхідною умовою успішного загоєння рани шляхом відновлення місцевої мікроциркуляторного русла та відновлення нормоксичних умов.

Розвинений стан гіпоксії індукує метаболічне перепрограмування від окисного фосфорилювання до аеробного гліколізу, таким чином посилюючи запалення та окислювальний стрес у пошкоджених тканинах [103]. У свою чергу, дефіцит кисню та ослаблена функція мітохондрій викликають аутофагію, еволюційний консервативний процес, який спрямований на

підтримку виживання клітин під час метаболічної недостатності або несприятливих умов за допомогою механізму, який може частково деградувати та переробляти клітинні компоненти [156]. Аутофагія відіграє подвійну роль на різних фазах процесу загоєння ран. З одного боку, аутофагія виявляє антимікробну дію в ранах, посилює імунну активність нейтрофілів, сприяє перетворенню макрофагів у фенотип M2, забезпечуючи імуносупресію та сприяючи відновленню тканин, захищає ендотеліальні клітини від окислювального пошкодження та підтримує ангіогенез, сприяє правильному відновленню тканин. -епітелізація шляхом індукції проліферації та диференціювання кератиноцитів [105]. Хоча аутофагія полегшує відновлення та реконструкцію пошкоджених тканин у здоровому організмі, порушення регуляції аутофагії може мати шкідливі наслідки для загоєння ран при діабеті. Кілька досліджень продемонстрували, що аномально посилена аутофагія в умовах гіперглікемії провокує апоптоз фібробластів і аутофагічну загибель, пригнічує їх проліферацію, затримує і стимулює утворення гіпертрофічних рубців [62,175]. Було показано, що інгібування аутофагії полегшує закриття ран частково залежно від передачі сигналу YAP/IL-33 у мишачій моделі загоєння ран шкіри [62]. Відповідно до наведених вище даних ми показали, що вплив Pg знижує рівень співвідношення LC3-II до LC3-I з наступним швидким закриттям рани. Можливо, Pg знижує експресію аутофагосомного білка LC3-II як відмітну ознаку зниження інтенсивності аутофагії через пом’якшення подій гіпоксії для покращення оксигенації та поживних речовин клітин у пораненій області. Крім того, Fallah et al. [55] рішуче показали, що Pg діє як плейотропний модулятор транскриптома, який порушується при радіаційних ранах. Pg покращує експресію багатьох генів, пов’язаних із загоєнням ран, до їх нормального рівня, включаючи гени, що беруть участь у регуляції метаболізму. Pg істотно пригнічував експресію генів, які відповідають за регуляцію гліколізу в сильно запалених тканинах, і підвищував рівень синтезу ліпідів. Таким чином, Pg-індуковане інгібування аутофагії та

метаболічне перепрограмування можуть являти собою втручання для покращення або відновлення загоєння ран і лікування виразок і формування патологічного рубця.

На підставі отриманих даних можна зробити висновки, що місцеве застосування Pg, отриманого з плазми, має виражений регенеративний ефект та сприяє загоєнню виразки стопи у пацієнтів з діабетом. Pg може прискорити швидкість загоєння ран шляхом запобігання шкірної гіпоксії, зменшення потоку аутофагії, зменшення надмірної активності ММР та посилення ангіогенної відповіді в тканині ранової області. Місцеві добавки Pg представляють собою багатообіцяючу стратегію для розробки нових терапевтичних підходів, які покращують загоєння ран у пацієнтів з діабетом, тоді як необхідні подальші тестування Pg для розробки засобів лікування дефектів шкіри іншого патогенезу.

РОЗДІЛ 5.
ОСОБЛИВОСТІ ПЛАСТИЧНОГО ЗАКРИТТЯ РАНОВИХ ДЕФЕКТІВ ХРОНІЧНИХ РАН У ПАЦІЄНТІВ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ

Хворі, які страждають на цукровий діабет досить чутливі до травмування внаслідок наявної у них нейропатії та схильності до повільного загоєння, або незагоєння ран взагалі. Основним проявом уражень тканин нижніх кінцівок при ЦД є хронічні рани 85%. До іншої групи входять абсцеси, флегмони, остеомієліти та гнійні артрити, які можуть виникати внаслідок трофічних виразок або травми [34,206]. Тому, проблема закриття ранових дефектів шляхом пластичних методик набуває особливої актуальності. Головним патогенетичним механізмом розвитку хронічних діабетичних ран є гіперглікемія, яка чинить токсичну дію на тканини, викликає обмінні порушення, що призводить до нейропатії, ангіопатії та імуносупресії [122,228,227]. Дані метаболічні зрушення стимулюють розвиток гіпоксії тканин із наступною активацією протеолітичних ферментів. За нормальних умов матриксні металопротеїнази (ММР) необхідні для кожної фази загоєння ран, відіграючи особливу роль у деградації позаклітинного матриксу (ECM), ремоделюванні тканин, міграції клітин і запаленні [157,207,209]. Протеази беруть активну участь у процесах відновлення ран, тому оцінка протеолітичної активності використовується як біомаркер стану загоєння ран. Серед усіх ММР членів, ММР-2 і -9 зазвичай беруть участь у нормальному ремоделюванні тканин під час загоєння ран [222]. Однак, як повідомляється, що драматичне підвищення активності ММР є ключовим фактором погіршення загоєння ран при діабетичних виразках шкіри та інших судинних ускладнень [87]. Тому очікується розробка підходів до модуляції протеолітичної активності для лікування ран, що важко загоюються. Сучасні дослідження визначили плазміноген (Pg) як одного з ключових учасників процесу загоєння ран. На даний момент виявлено понад 12 різних клітинних рецепторів Pg, які потенційно пов'язані із загоєнням ран

[107, 55]. Це означає, що окрім фібринолізу Pg може діяти як сигнальна молекула, яка регулює та координує активність моноцитів/макрофагів, кератиноцитів, тромбоцитів та інших клітин, які беруть участь у загоєнні ран [144, 167, 170, 173, 184,190].

Тому метою дослідження було, - дослідження ролі плазміногену в лікуванні та пластичному закритті хронічних діабетичних ран та виразок.

У дослідженні брали участь 20 пацієнтів із цукровим діабетом віком від 45 до 81 року, які перебували на амбулаторному лікуванні в умовах денного стаціонару хірургічного відділення Центральної поліклініки МВС України за період 2021 по 2023 роки із нейропатичними діабетичними ранами, які не загоювались більше 6 тижнів. Згідно класифікації PEDIS рани відповідали градації P1-2E8,4±1,3D1-2I1-2S2. [30]. Усі пацієнти дали письмову згоду на участь у дослідженні та дозвіл на публікацію результатів досліджень. Усі процедури та протоколи дослідження, використані в даному дослідженні, були розглянуті та схвалені місцевим етичним комітетом, і автори дотримувалися всіх етичних рекомендацій. Дослідження відповідають принципам, викладеним в останній редакції Гельсінської декларації (2013).

Пацієнти даної групи мали трофічні виразки на тлі діабетичної полінейропатії від 6 місяців до 2 років. Розміри виразок коливались від 4,5±0,5 см^2 до 7,2,4±1,2 см^2. Разом з тим, до групи було включено 4 пацієнтів розмір ранових дефектів становив 32,4±1,5 см^2.

Пацієнти досліджуваної групи плазміноген на ранову поверхню в дозі 1,0 мг/мл стерильного забуференого фізіологічного розчину кожні 2 дні, протягом 20 діб (загалом 10 аплікацій). Біоптати із ложа рани у пацієнтів з цукровим діабетом (100 ± 3 мг) відбирали перед початком лікування Pg (0 день) та на 18 добу поточного періоду лікування з метою дослідження активності матриксних металопротеїназ ММР-2,-9 у тканинах та визначення об’єктивних критеріїв, які послугують достовірними маркерами готовності рани до пластичного закриття.

Нативну форму Pg (Glu-Pg) одержували зі свіжої цитратної плазми крові донорів (пацієнти з цукровим діабетом з дослідної групи) методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну (10 мг/мл) за Lijnen [104] з мінорними модифікаціями. Чистоту одержаних препаратів Pg оцінювали за допомогою денатуруючого гель-електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). Результати гель-електрофорезу свідчать, що препарати Glu-Pg, ізольованого з плазми крові донорів, були електрофоретично гомогенними (ступінь чистоти 99 %). Перед використанням препарати Pg перевіряли на наявність спонтанної амідолітичної активності за допомогою фотометричного методу з використанням специфічного хромогенного субстрату плазміну S_{2251} та брали до роботи лише ті, які не проявляли спонтанної активності. Препарати протеїну концентрували, стерилізували ультрафільтрацією та зберігали за –20°С до використання.

Активність ММР-9 в біоптатах ранової поверхні шкіри оцінювали за допомогою желатинової зимографії і порівнювали її з активністю ММР-9 у біоптатах з гострих ран. Желатинолітичну активність аналізували шляхом розділення протеїнів (50 мкг/доріжку) у 8% поліакриламіді, кополімеризованому з желатином (5 мг/мл). Після денатуруючого електрофорезу гелі промивали двічі протягом 30 хв. у холодному 2,5 % (v/v) Triton X-100 для видалення SDS, а потім 5 разів протягом 5 хв. у холодній бідистильованій воді. Після промивання гелі інкубували протягом 16 год. при 37 ^{o}C у буфері для проявлення (50 мМ трис-HCl, pH 7,6, що містить 0,15 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $ZnCl_2$ і 0,02 % Tween-20). Зимограми фарбували 0,15% спиртовому розчині Coomassie R-250. Знебарвлення проводили у розчині 30 % метанолу та 10 % оцтової кислоти, що не містив барвника. Після знебарвлення гель мав рівномірний блакитний фон, за винятком тих зон, до яких мігрували ММР та розщеплювали субстрат. Желатинолітичну активність ідентифікували як прозорі смуги на фоні желатину, забарвленого

кумасі. Отримані смуги ММП візуалізували та проводили кількісний денситометричний аналіз.

При статистічній обробці для аналізу даних зимографії використовувався *U*-критерій Манна-Уїтні для оцінки відмінностей між середніми параметрами. Усі змінні були виражені як середнє ± стандартна помилка середнього (S.E.M.). Для всіх тестів $P < 0,05$ вважалося статистично значущим. Для виконання всіх статистичних розрахунків використовувалося програмне забезпечення «OriginPro» (основна версія 9.0 SR2 Pro English).

Нерідко консервативна терапія може мати самостійне значення у лікуванні нейропатичних діабетичних ран. За повідомленнями деяких авторів, частота загоєння ран стоп становить 80-90%, причому, приблизно 2/3 пацієнтів хірургічного вручання не потребують [75, 210,211]. Для досягнення позитивного результату в даному випадку необхідно дотримання усіх протоколів лікування, правил асептики та антисептики, та необмежений час (до 8 місяців). Разом з тим, існуюча тривалий час рана є потенціальним джерелом для подальшого інфікування та сприяння утворенню нових гнійних вогнищ на кінцівці. Тому, основна тенденція лікування даних ран полягає у закритті ранових дефектів у можливо ранні терміни, для попередження виникнення ускладнень та прогресуванню деструкції тканин [143,212,216]. Головною умовою для виконання пластичних операцій є нормалізація стану хворого, достатнє кровопостачання м'яких тканин кінцівки, усунення гнійного запалення. Рана повинна бути з низким рівнем бактеріологічного обсемінення (критичний рівень 10^5 мікробних тіл на 1 г тканини), заповнена здоровими грануляціями з мінімальною ексудацією. Пластична операція повинна призвести до повного закриття ранового дефекту та профілактики деформацій.

Найчастіше виконуються наступні види пластичних операцій: аутодермопластика (АДП) при обширних дефектах на тилі стопи; пластика методом дозованого розтягенння тканин або місцевими тканинами при

дефектах на гомілці середнього розміру; пластика місцевими тканинами в ділянці гомілковоступневого суглобу та незначних лінійних ранах на тилі стопи; пластика місцевими тканинами при дефектах в «точках підвищеного тиску»; аутодермопластика при дефектах медіального підошвового своду стопи; ротація тильного клаптя для закриття торцевого та підошвового дефекту; ротація підошвового клаптя для закриття бокових та торцевих дефектів стопи.

Застосування аплікацій плазміногену у пацієнтів основної групи дозволило досягти повного загоєння у 16 пацієнтів із ранами із площею до 10 $см^2$ на 20-24 добу лікування. Натомість, у 4 пацієнтів із ранами на тильній поверхні гомілки та стопи, площа яких сягала понад 30 $см^2$ головною задачею було очищення ранової поверхні та підготовка її до пластичного закриття. До початку лікування рана мала характерний вигляд: ранова поверхня вкрита фібрином, набрякла, виступає над поверхнею шкіри, грануляції крупнозернисті, мали «нездоровий» блідо-сірий колір, ексудат помірний, але з неприємним запахом (Рис.1).

Рис.1. Діабетична хронічна рана до лікування автологічним Pg

Активність желатиназ була високою. На зимограмах відмічено патологічне збільшення рівня ММР-9, що характерно для перебігу хронічних ранових процесв. Після застосування аплікацій аутологічного Pg за розробленою нами методою відмічено повне очищення ран від фібрину та некротичних тканин, зменшення набряку починаючи з 10 доби лікування. Грануляції були дрібнозернистими, мали «здоровий» вигляд, ексудат скудний. При бактеріологічному дослідженні патогенних мікроогранізмів не виявлено, а при гістологічному – повна відсутність «біоплівки». Починаючи із 14 доби констатовано прогресивну ретракцію площі рани, що свідчило про сприятливі умови для проведення пластичних операцій (Рис.2).

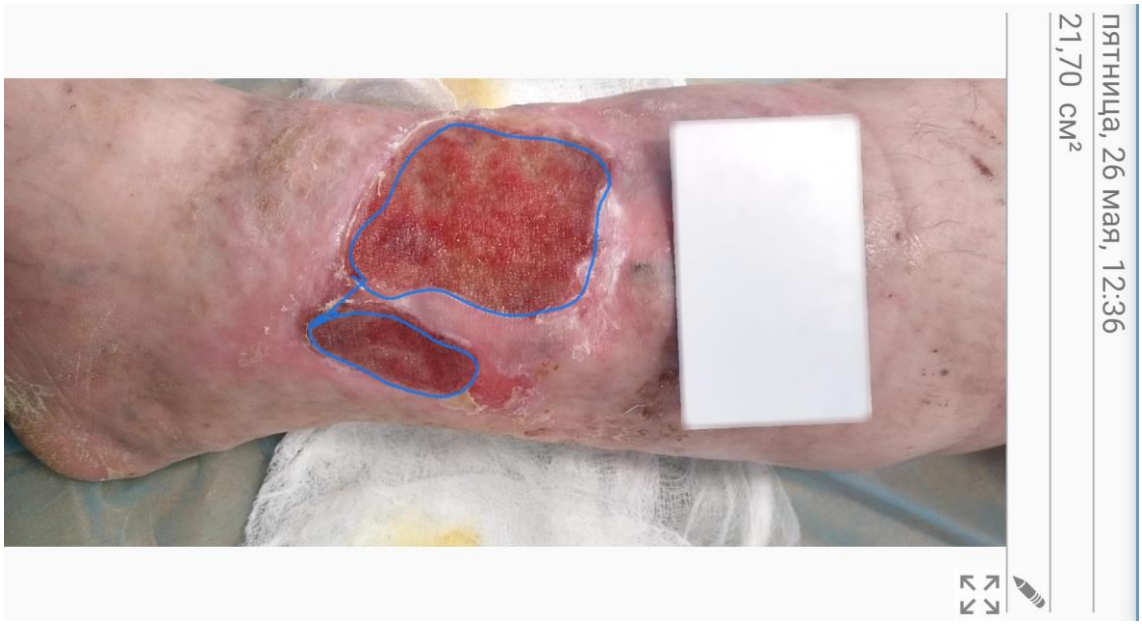
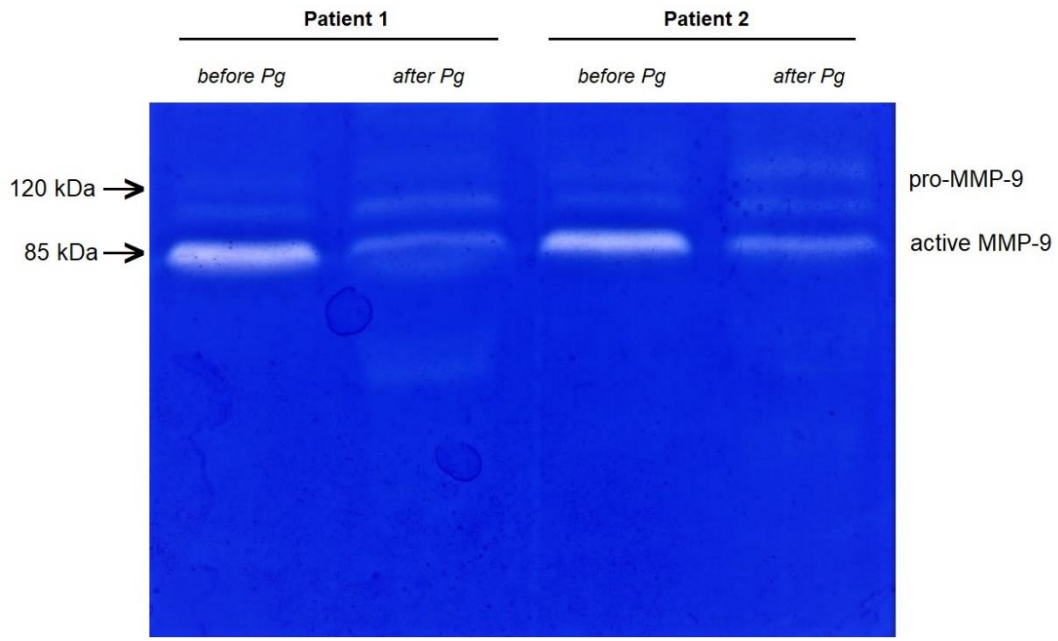


Рис.2. Діабетична хронічна рана на 12 добу лікування автологічним Pg

Разом з тим, відмічено достовірне зниження активності ММР в тканинах ран у 3,5 рази на 18 добу лікування $P<0,01$ Разом з тим активність ММР у гострих ранах була мінімальною протягом усього періоду лікування, а на 18 добу носила слідовий характер (Рис.3).



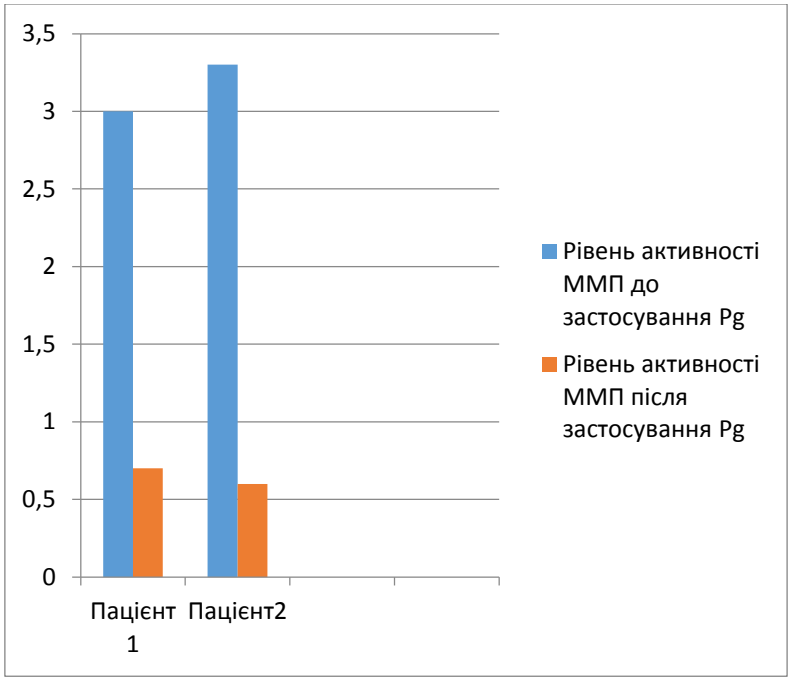


Рис. 3. Вплив аплікацій плазміногену на рівні активності ММР-9 в хронічних ранових дефектах у пацієнтів з цукровим діабетом (типова желатинова зимографія).

Ранові дефекти було закрито за допомогою АДП повношаровим перфорованим шкіряним трансплантатом (Рис.4). Усі трансплантати прижились.

Рис.4. Приживлення трансплантату на 10 добу після пластичного закриття рани.

Рис. 5 Приживлення трансплантату на 45 добу після проведення аутодермопластики

Зменшення площі рани та активна крайова епітелізація внаслідок лікування аплікаціями плазміногеном характерно на прикладі пацієнтки П. 67 років. Хронічна рана на тлі цукрового діабету на латеральній поерхні правої гомілки існувала протягом 3 років. Рана мала типовий вигляд хронічної: відсутність грануляцій та крайової епітелізації, гладка поверхня, подекуди вкрита залишками фібрину, ексудативний вміст прозорий, обильний, без запаху. При пальпації помірна болючість.

Рис.6. Вигляд типової хронічної виразки на латеральній поверхні гомілки у пацієнтки з цукровим діабтом до початку лікування автологічним плазміногеном.

На 6 добу лікування та проведення 3 аплікацій плазміногеном стан ранової поверхні суттєво змінився. Явиша перифокального запалення пройшли, появилась грануляційна тканина, Ранова поверхня чиста, без залишків фібрину. Ексудація мінімальна, без запаху, пальпаторно пацієнтка болів не відмічала. Появились ознаки крайової епітелізації. Характерні зміни на 6 добу лікування представлені на Рис 7.

Рис.7. Стан ранової поверхні на 6 добу лікування автологічним плазміногеном

Починаючи з 14 доби лікування автологічним плазміногеном рана повністю очищалась від нашарувань фібрину. Грануляції набували «здорового» вигляду, в той же час були дрібнозернистими, щільними та були темно-чевоного кольору. На перше місце виходила крайова епітелізація яка розповсюджувалась центробіжно. Відмічено нашарування кератиноцитів, які виповняли весь периметр рани. Виділення мінімальні. Перев'язки рани стали безболісні. При бактеріологічному дослідженні росту мікроорганізмів не зафіксовано. На желатинових зимограмах рівень активності матриксних металопротеїназ ММР-9 знизився у 4,5 разів. (Пацієнт№1. Рис.3). Такі ознаки як ретракція ранової поверхні, поява «здорових» грануляцій, крайова енітелізація разом із модуляцією активності матриксних металопротеїназ у тканинах ран можуть слугувати маркерами готовності рани до пластичного закриття. За таких умов варіант лізису трансплантату буде мінімальний. Характерний вигляд ранової поверхні на 14 добу лікування представлено на Рис.8.

Рис.8. Вигляд ранової поверхні на 14 добу лікування автологічним плазміногеном.

В даному випадку пацієнтка відмовилась від проведення пластичних операцій по закриттю ранового дефекту, тому нами було принято рішення припинити аплікації плазміногеном зогляду на той факт, що ініціація запалення відбулась у повній мірі і рановий процес перейшов у стадію проліферації. Додавання на даній стадії загоєння плазміногену, для подальшого провокування запалення, виявилось не доцільним.

На 20 добу після початку лікування автологічним плазміногеном (було застосовано 7 аплікацій) ранова поверхня продовжувала закриватись епітеліальними клітинами, які розповсюджувались від периферії та острівців епітелізації, та з'являлись на грануляційній поверхні рани. Зміни ранової поверхні на 20 добу лікування представлені на Рис.9.

Рис.9. Вигляд ранової поверхні трофічної виразки на 20 добу лікування автологічним плазміногеном.

В подальшому лікування пацієнтка використовувала мазьові пов'язки, через день, проводила еластичне бинтування гомілки, дотримувалась режиму дозованої ходьби. На 26 добу ранова поверхня зменшилась у розмірах, грануляційна тканина поступово заміщувалась епітеліальними клітинами. Краї рани були щільно вкриті нашарурванням кератиноцитів. Даний вигляд рани свідчив за повне закриття ранового дефекту, внаслідок ініціації та резолюції запалення, каталізатором якого слугували аплікації автологічного плазміногену. Вигляд ранової поверхні на 26 добу лікування продемонстровано на Рис.10.

Рис.10. Ранова поверхня трофічної виразки у пацієнта з цукровим діабетом на 26 добу лікування автологічним плазміногеном.

У пацієнтів контрольної групи, які отримували традиційне лікування, починаючи з 20 доби лікування відмічено зменшення ознак перифокального запалення та очищення ран від залишків фібрину та некротичних тканин. Рівень активності матриксних металопротеїназ залишався стабільно високим. В подальшому, очищення ранової поверхні та зменшення площі ран відбувалось поступово із залученням нових форм ранових покриттів та інстументальних методів. Контракція ранової поверхні наступала починаючи з 30 доби лікування. Причиною тривалого та не завжди успішного лікування хронічних діабетичних ран є драматична активність матриксних металопротеїназ. Агресивна дія яких повністю нівелює усі зусилля по лікуванню ран. Навіть повне очищення ран від мікробного компонента не дає гарантії для успішного загоєння. Проведення пластичних операцій по закриттю ранової поверхні не буде мати успіху в даному випадку, та приведе до повного лізису трансплантата до тих пір, доки не буде нейтралізовано активність протеаз. Як було продемонстровано у наших попередніх дослідженнях, [116] не дивлячись на застосування вакуум-терапії при лікуванні хронічних діабетичних ран, рівень активності ММР в ексудаті

даних ран залишається досить високим. Навіть після проведення вакуумної терапії.

Механізм дії Pg при хронічних ранових процесах полягає, в першу чергу, у ліквідації тканинної гіпоксії шляхом розчинення мікротромбів у судинах за рахунок своїх фібрінолітичних властивостей . Процес переходу плазміногену у плазмін супроводжується підвищеною активністю прозапальних цитокінів, які містяться в тканинах ран [144, 167, 170, 173, 184, 190]. Експресія даних факторів ініціює запалення та стимулює ангіогенез, який є основною складовою для подолання «порочного кола» хронічного запалення та переходу ранового процесу на іншу стадію загоєння ран - стадію проліферації.

Активність матриксних металопротеїназ у хронічних діабетичних ранах сягає драматичних значень, в результаті чого самостійне загоєння ран стає неможливим. Застосування аплікацій автологічного Pg дозволяє модулювати дану активність, створити сприятливі умови для загоєння шляхом зменшення надмірної активності ММР, покращення кровопостачання та усунення запальних процесів. Місцеве застосування автологічного Pg представляє собою багатообіцяючу стратегію для розробки нових терапевтичних підходів, які покращують загоєння ран у пацієнтів із цукровим діабетом.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Постійне збільшення кількості хворих на цукровий діабет (ЦД) є значною соціальною та медичною проблемою. Згідно з інформацією Міжнародної діабетичної федерації (IDF) у 1996 році, кількість хворих на діабет у світі становила приблизно 120 мільйонів, станом на 2021рік хворих на ЦД серед дорослого населення (20–79 років) складає близько 537 млн людей на Земній кулі. Прямі витрати на охорону здоров'я зв'язані з ЦД вже наближаються до одного трильйону доларів США, та перевищать її в 2030р. [34, 111,148,134]. Цьому сприяє збільшення віку та населення планети, ожиріння та малорухомий спосіб життя [8,53,134].

Найбільш серйозними проблемами є пізні ускладнення діабету, які уражають міокард, нирки, сітківку очей та судини нижніх кінцівок. В даному переліку «стопа діабетика» займає провідне місце. За даними літератури при тривалості захворювання більше 20 років, вірогідність ураження судин нижніх кінцівок перевищує 80% [131, 111], а 40-70% всіх нетравматичних ампутацій проводяться у хворих на ЦД, при цьому найближча післяопераційна летальність перевищує 20% [88, 109].

За інформацією IDF, від 25% до 47% випадків госпіталізації пацієнтів із цукровим діабетом пов'язані із ураженням стоп. Хронічні ранові ушкодження нижніх кінцівок відзначаються у 15–25% хворих на цукровий діабет, що є причиною високих рівнів ампутацій у 12% цих пацієнтів. За даними літератури через 3-5 років після ампутації майже у 50% хворих приходиться ампутувати і другу кінцівку в (з летальністю 39–80%) [102,127,146,] Гнійно-некротичні ураження стоп у пацієнтів на ЦД відмічаються в 20 раз частіше, ніж у хворих які не страждають на діабет [130,69].

Ураження нижніх кінцівок при цукровому діабеті призводять до серйозних економічних збитків, що становлять приблизно 10% національних бюджетів охорони здоров'я в розвинених країнах [16,177]. СДС є медико-соціальною проблемою, яка вимагає значних матеріальних витрат на профілактику та лікування. Останнім часом були розроблені та впроваджені методичні рекомендації з лікування СДС, що значно покращило результати лікування [84,160]. Результатом хірургічної тактики лікування СДС, яка включає проведення хірургічної обробки та виконання "малих ампутацій", є формування обширних раневих дефектів [77,121,125]. Утворені рани на фоні цукрового діабету та в результаті спотворення ранового процесу перетворюються в хронічні. Збільшення захворюваності на СДС робить актуальним пошук нових методів місцевого лікування хронічних ран[67,96,232].

Слід зазначити, що усі наявні способи лікування «хронічних ран» при СДС спрямовані на лікування ранових дефектів шляхом мінімізації дії факторів які перешкоджають загоєнню ран, що заключається у механічному очищенні ранової поверхні від агресивного середовища, яке формують мікроорганізми. Разом з тим, дані методи лікування ніяким чином не впливають перебіг репаративних процесів у діабетичних ранах, де загоєння ран, в силу різних чинників, зупинилось на фазі запалення та перейшло у хронічну фазу. У зв'язку з цим, останніми роками проводиться інтенсивний пошук способів впливу молекулярно-клитинних технологій на ініціацію та реалізацію запалення саме у «хронічних» діабетичних ранах. Тому наше дослідження було спрямоване на дослідження та регуляції процесів загоєння у діабетичних ранах на молекулярному рівні. Зокрема, в ході дослідження було оцінено можливість використання аплікацій плазміногену, ізольованого з автологічної плазми крові, як ранозагоювального засобу. Результати фундаментальних наукових досліджень останніх років визначають плазміноген – центральний протеїн системи гемостазу і прозапальний

медіатор – як «*master regulator of wound healing»* (ключовий регулятор загоєння ран) (Fallah M. et al., Cell Death Dis., 2020). У цьому контексті запланованe дослідження є унікальним і не має аналогів у світі.

Тому, метою нашого дослідження було - покращення результатів лікування пацієнтів з синдромом діабетичної стопи шляхом оптимізації процесів загоєння та удосконалення хірургічної тактики із застосуванням клітинних технологій . На основі отриманих результатів удосконалити методику лікування хворих з хірургічними ускладненнями СДС.

Для реалізації цієї мети необхідно вирішити наступні завдання:

– дослідити експресію регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії разом із активністю матриксних металопротеїназ у біоптатах тканин діабетичних ран та провести порівняльний аналіз експресії даних цитокинів із їх активністю в гострих ранах за умов нормоглікемії;

- дослідження впливу аплікацій автологічного плазміногену на процеси ініціації та резолюції запалення у хронічних ранах у пацієнтів на цукровий діабет, шляхом вивчення та моніторингу біохімічних змін активності цитокинів;

- на основі клінічних, бактеріологічних, біохімічних критеріїв, дослідження активності тканинних протеаз дослідити ефективність поєднання аплікацій автологічного плазміногену та автодермопластики у лікуванні ранових дефектів у пацієнтів з синдромом діабетичної стопи;

-на підставі отриманих даних оптимізувати патогенетично обґрунтовані критерії для використання аплікацій автологічного плазміногену в комплексному хірургічному лікуванні пацієнтів із синдромом діабетичної стопи.

- оцінити ефективність нових методів лікування хронічних ран у пацієнтів з синдромом діабетичної стопи.

Для вирішення задач дослідження на першому етапі було вивчено віддалені результати хірургічного лікування хворих на хронічні рани у пацієнтів із синдромом діабетичної стопи, які знаходились на амбулаторному лікуванні у хірургічній клініці кафедри хірургії №2 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця за період 2017-2020 рр. (I група хворих – 36 осіб). Аналіз результатів лікування дозволив визначити шляхи їх покращення, що включало в себе застосування удосконаленої методики лікування хворих, розробку та апробацію нових способів лікування ран. В результаті було удосконалено технологію хірургічного лікування хворих на хронічні рани у пацієнтів із нейропатичною формою синдрому діабетичної стопи, яка була апробована в клініці за період 2020 – 2023 рр. (II група хворих – 45 осіб).

Для визначення ефективності застосування аплікацій автологічного плазміногену хворі II групи було поділено на 2 підгрупи – контрольну та досліджувану. Пацієнти контрольної групи отримували стандартне лікування, пацієнти досліджуваної групи – разом із стандартним лікування отримували аплікації автологічного плазміногену на хронічні рани.

У дослідженні ми використовували класифікацію PEDIS (Perfusion, Extent, Depth, Infection, Sensation) яка була запропонована в 2003 р. та переглянута в 2011р., яка враховує не тільки глибину уражених тканин, а і стан периферичного кровопостачання, інервації, важкість інфекційного процесу. Її застосування пред’являє детальну інформацію про наявне пошкодження лікарям, які займаються лікуванням СДС на різних етапах (хірургічний та ендокринологічний стаціонар, поліклініка).

У пацієнтів досліджуваної групи співвідношення чоловіків та жінок становило 1:2.1, а питома вага пацієнтів старше 50 років становила 75,5%. Середній вік хворих складав 65,4±4,3 роки. Тривалість захворювання у обстежених хворих на цукровий діабет становила від 10 до 25 років у середньому складала 12,6±2,4 років. Тривалість існування хронічної рани на час звернення у клініку становила від 3 місяців до 2 років. Усі 45 пацієнтів мали субкомпенсовану стадію цукрового діабету та нейропатично-інфіковану форму ураження діабетичної стопи.

Причинами хронічних ран даної групи хворих були: перенесені в минулому оперативні втручання (санація гнійних процесів на ступні та ампутація пальців – 28 пацієнтів). Також у 15 пацієнтів мали місце трофічні виразки на гомілці внаслідок недостатності кровопостачання. До участі у дослідженні залучали пацієнтів із діаметром ранових дефектів від 1,0 до 15,0 см. Пацієнтів порівняльної групи було розділено на дві підгрупи (досліжувану та групу контролю). Всім пацієнтам призначалась консервативна терапія, орієнтована на патогенез, з використанням стандартних схем, включаючи обов'язкове розвантаження кінцівки. Пацієнтам контрольної підгрупи (n=20) призначали місцеве лікування ранових дефектів, яке включало застосування ранових покриттів (Н, М,) обробку ран антисептиками (Х,Б,Д,), мазями (Б, С, О, Обл, Мір) в залежності від фази ранового процесу та застосування вакуум терапії. Пацієнти дослідної групи отримували аплікації автологічного плазмінногену на ранову поверхню, після обробки останньої розчином хлоргексидіну.

Всім хворим проводилося комплексне клініко-лабораторне та інструментальне обстеження. Воно включало в себе детальний збір скарг та анамнезу захворювання і об’єктивного обстеження пацієнтів, що дозволяло діагностувати тип та важкість ЦД, патогенетичну форму СДС, характер і поширеність гнійно-некротичного процесу. Клінічне обстеження доповнювалося рядом лабораторних та інструментальних досліджень.

Лабораторне обстеження включало в себе вивчення показників гемограми, біохімічного аналізу крові, коагулограми, ступеня глікемії і глюкозурії, наявності кетонових тіл в сечі.

Ступінь гемодинамічних змін в нижніх кінцівках оцінювали за допомогою розрахунку плече-кісточкового індексу (КПІ) та ультразвукового дуплексного сканування артерій нижніх кінцівок апаратом TOSHIBA" Nemio XG SSA–580A з використанням датчиків 4–5 МГц для великих і 8–10 МГц для середніх та дрібних судин.

Усім пацієнтам II групи проводили дослідження біоптатів тканин. Рівні регуляторних білків, пов'язаних з репаративними процесами та загоєнням ран, таких як фактор-1α, індукований гіпоксією (HIF-1α), фактор росту ендотелію судин (VEGF), ангіостатини та маркер аутофагії LC3, вимірювали за допомогою вестерн-блоттингу на початку лікування та на 18 добу проведеного лікування. Відбір матеріалу та підготовку дослідного матеріалу виконували за спеціальною методикою.

Шкірні біоптати з ложа рани відбирали у пацієнтів з цукровим діабетом перед першим застосуванням Pg (0 день) і на 18-й день поточного періоду лікування. Кожен зразок тканини складався з шарів шкіри cutis і subcutis. Відразу після збору всі біоптати зберігали при –80^{o} С до аналізу. Зразки білка зразків тканини для вестерн-блотів готували шляхом подрібнення в рідкому азоті та гомогенізації в крижаному 50 мМ трис-HCl буфері (pH 7,4), додатково містив 150 мМ NaCl, 0,1% SDS, 1,0% Triton X-100 і доповнюється сумішшю інгібіторів протеаз/фосфатаз. Білкові екстракти для аналізу ММР готували з використанням того ж лізованого буфера, який не містив інгібіторів ферментів. Співвідношення тканина/буфер приймали рівним 1:5 (м/об). Після етапів гомогенізації зразки обробляли ультразвуком протягом 60 секунд за допомогою ультразвукового дезінтегратора Sartorius (Labsonic® M, Геттінген, Німеччина) і центрифугували при 16 000 g протягом 45 хвилин при 4 оС. Концентрацію загального білка в кожному супернатанті визначали

спектрофотометрично за методом Стошека [17]. Зразки розводили 1:1 у буфері Laemmli Sample Buffer, заморожували та зберігали при –80 оС перед аналізом.2.5. Western blot analysis.

Рівні регуляторних білків, пов'язаних з репаративними процесами та загоєнням ран, таких як фактор-1α, індукований гіпоксією (HIF-1α), фактор росту ендотелію судин (VEGF), ангіостатини та маркер аутофагії LC3, вимірювали за допомогою вестерн-блоттингу. Зразки розділяли електрофоретично в 10% SDS-PAGE (100 мкг білка на доріжку). Білки переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани з розміром пор 0,45 ± 0,2 мкм (Amersham Biosciences, Упсала, Швеція) за допомогою електроблоту. Мембрани блокували в 5% розчині знежиреного знежиреного молока (ApexTM Bioresearch Products, США) протягом 90 хв при 37 оС. Після блокування блоти досліджували первинними антитілами проти β-актину як контролем навантаження (Invitrogen, США, № MA5-15739), HIF-1α (Sigma Aldrich, США, № HPA001275), VEGF (Invitrogen, США). , № MA5-12184), LC3 (Sigma Aldrich, США, № L8918) або ангіостатини (вироблені, як описано в іншому місці [18]) при 4°C протягом ночі. Мембрани промивали у фосфатно-сольовому буфері (pH 7,4), що містив 0,05% Triton X-100 (PBST), та інкубували з відповідними анти-видовими антитілами, кон'югованими з вторинною пероксидизою хрону (HRP) (козячими анти-кролячими або антимишачими). IgG, Invitrogen, США, кат.№ G-21234 і 31430 відповідно) протягом 90 хв при 37 оС. Після промивання в PBST мембрани інкубували з субстратом HRP і експонували на рентгенівській плівці (Konica Minolta, Японія) за допомогою технології посиленої хемілюмінесценції (ECL). Сигнали візуалізували, оцифровували та аналізували за допомогою програмного забезпечення TL120 (TotalLab Ltd., США). Молекулярні маси визначали за допомогою стандартних попередньо пофарбованих трансблот-маркерів молекулярної маси (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Німеччина). Рівні білка виражали в довільних одиницях після корекції на β-актин.

Активність ММР-9 оцінювали за допомогою желатинової зимографії в біоптатах з уражень шкіри, щоб оцінити ефекти лікування Pg діабетичних ран і порівнювали її з активністю ММР-9 у біоптатах з гострих ран. Желатинолітичну активність аналізували шляхом розділення білків (50 мкг/доріжку) у 8% поліакриламіді, кополімеризованому з желатином (5 мг/мл), як описано раніше [19]. Коротко кажучи, після денатуруючого електрофорезу гелі промивали двічі протягом 30 хвилин у холодному 2,5 % (об'єм/об'єм) Triton X-100 для видалення SDS, а потім 5 разів протягом 5 хвилин у холодній бідистильованій воді. Після промивання гелі інкубували протягом ночі при 37 оС у буфері для проявлення (50 мМ трис-HCl, pH 7,6, що містить 0,15 М NaCl, 5 мМ CaCl2, 1 мМ ZnCl2 і 0,02 % Tween-20. Зимограми фарбували 0,15 % кумасі. Розчин Brilliant Blue R-250 (Merck Millipore, Німеччина) у 30 % метанолі та 10 % оцтової кислоти та знебарвлення у тому самому розчині без кумасі синього Кінцевий гель мав рівномірний блакитний фон, за винятком тих областей, до яких мігрували та розщеплювалися ММР. Желатинолітичну активність ідентифікували як прозорі смуги на фоні желатину, забарвленого кумасі синім. Отримані смуги ММР візуалізували та кількісно визначали денситометрично.

Нативний Glu-Pg виділяли та очищали з 20-25 мл свіжої цитратної плазми пацієнта за допомогою афінної хроматографії на лізин-сефарозі (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Упсала, Швеція), як описано раніше. Індивідуально приготовлений Pg мав 95-99% чистоту, як оцінювали SDS-PAGE. Виділений Pg не виявляв спонтанної протеолітичної активності, як оцінювали спектрофотометрично з використанням специфічного хромогенного субстрату S-2251. Pg розчиняли в стерильному забуференому фізіологічному розчині, зберігали при –20 оС і перед використанням доводили його концентрацію до 1,0.

Щоб дослідити вірогідні молекулярні механізми загоєння ран, на першому етапі нашого дослідження були кількісно визначені ключові

маркери гіпоксії та ангіогенезу в біоптатах діабетичних ранах та гострих ранах нормальних тканин. Показано, що експресія центрального регулятора гіпоксій-асоційованих процесів HIF-1α в діабетичних ранах була підвищена у 4,4 раза порівняно з значеннями в гострих ранах ($P<0,01$). Отримані дані свідчать за те, що у діабетичних ранах має місце значна тканинна ішемія.

Вестерн-блот VEGF зі зразків нормальної та виразкової тканин демонструють слідові кількості цього фактору росту у випадку діабетичної рани. Рівень експресії VEGF у гострих ранах у 2 рази вище ніж у діабетичних ранах ($P<0,05$).

Експресія регуляторів, що протидіють ангіогенезу та VEGF зміщує ангіогенний баланс у бік стану ішемії. Показано, що загальний вміст ангіостатину у діабетичних хронічних ранах перевищував у 2,5 рази порівняно із гострими ранами ($P<0,05$). Ці результати означають, що ангіогенна відповідь через підвищення регуляції утворення ангіостатину призводить до зниження експресії VEGF у тканинах.

У цьому дослідженні нами проведено порівняння активності ММП у осіб з гострими (операційними) ранами та трофічними виразками стоп у хворих на цукровий діабет. Желатинова зимографія показала, що гострі рани містять слідові кількості активної ізоформи ММР-9, тоді як рясність активності ММР-9 визначена в діабетичних виразках

На відміну від гострої гіпоксії, яка сприяє проліферації клітин і формує повністю функціональну судинну мережу для забезпечення адекватного постачання киснем, таким чином полегшуючи відновлення тканин, хронічна гіпоксія може викликати тривале запалення, глибокий розрив судин, посилення коагуляції, порушення повторної епітелізації та некроз, що призводить до сповільненого загоєння. Тканинна гіпоксія індукує стійке підвищення експресії HIF-1α, який вважається центральним регулятором метаболізму кисню та маркером тяжкості гіпоксії. HIF-1α є фактором транскрипції, який посилює експресію багатьох генів, відповідальних за виживання клітин і правильний процес відновлення ран. Є

значні докази того, що передача сигналів HIF-1α порушується при захворюваннях, які характеризуються порушенням загоєння ран, таких як цукровий діабет. Серед інших генів регуляторних шляхів, індукованих гіпоксією, експресія HIF-1α запускає продукцію VEGF, потужного проангіогенного фактора. VEGF відповідає за неоваскуляризацію та ремоделювання судин для забезпечення реоксигенації пошкодженої тканини, тоді як нездатність рани активувати VEGF призводить до погіршення загоєння ран. До певної міри несподівано ми показали зворотну кореляцію між рівнями HIF-1α та VEGF у дермальних біоптатах, зібраних із хронічних уражень шкіри. Це спостереження можна пояснити тим фактом, що синтез VEGF відбувається залежним від часу способом після активації керованого гіпоксією сигнального каскаду. З іншого боку, затримка експресії VEGF в пошкодженій тканині може бути результатом множинних інгібіторних ефектів ангіостатинів, які, як повідомлялося, є потужними супресорами ангіогенезу через інгібування експресії VEGF і протидію передачі сигналів VEGF. Ангіостатини є протеолітично отриманими фрагментами Pg/Pm, що містять різну кількість кринглових (K) доменів білків-попередників. Спочатку ангіостатини досліджувалися як пухлинно-асоційовані ангіоінгібітори, які пригнічують спричинену пухлиною неоваскуляризацію та обмежують утворення метастазів шляхом індукції апоптозу в ендотеліоцитах і зниження їх міграційної активності. Нами встановлено, що біоптати з хронічних діабетичних ран містять велику кількість ізоформ ангіостатину, і це узгоджується з нашим попереднім дослідженням, у якому ми виявили масивне накопичення ангіостатину в пошкодженій дермі з хронічної рани пацієнта з гіпертонічною виразкою шкіри

ММР відомі як «скульптори ремоделювання тканин», які відіграють багато ролей у нормальному процесі загоєння, залучаючись до ремоделювання ECM та контролю активності, вивільнення та біодоступності цитокінів і факторів росту. Однак неконтрольоване та постійне посилення експресії ММР у ураженнях шкіри сприяє патофізіології порушень загоєння та розглядається

як негативний прогноз для загоєння ран. У дослідженні, що проведено, показано, що зразки з гострих ран містили дуже низькі рівні активного ММР-9 порівняно з аналогами з хронічних виразок стопи.

Лікування на основі Pg впливало на експресію регуляторів, що протидіють ангіогенезу, ангіостатину та VEGF, таким чином зміщуючи ангіогенний баланс у бік стану активації. Показано, що поліпептиди ангіостатину представлені у вигляді набору смуг 50, 45 і 38 кДа, які відповідають ізоформам K1-4,5, K1-4 і K1-3. Лікування Pg зменшувало загальний вміст ангіостатину на 18-й день у 2,5 раза порівняно з вихідним рівнем ($P<0,05$), водночас збільшуючи експресію VEGF у біоптатах рани в 1,9 раза ($P<0,05$). Ці результати означають, що Pg сприяє ангіогенній відповіді через зниження регуляції утворення ангіостатину та підвищення експресії VEGF у тканинах.

Результати кількісного аналізу білка LC3, пов'язаного з аутофагією, у дермальних біоптатах демонструють, що додавання Pg призвело до зниження співвідношення LC3-II/LC3-I на 18-й день лікування (у 8,6 разів, $P<0,05$). Цей результат свідчить про те, що використання Pg як варіанту лікування діабетичних хронічних виразок зменшує потік аутофагії, таким чином захищаючи тканини від аутофагічної загибелі клітин.

У хронічних ранах, які важко загоюються, надекспресія ММР давно відомо, що сприяє патофізіології порушень загоєння. У цьому дослідженні ми порівнювали активність ММП у осіб з гострими (операційними) ранами та трофічними виразками стоп у хворих на діабет, які отримували Pg. Желатинова зимографія показала, що

гострі рани містять слідові кількості активної ізоформи ММР-9, тоді як рясність активності ММР-9 визначена в діабетичних виразках (рис. 6). Можна припустити, що надмірна активність ММР-9 може сприяти порушенням загоєння ран і хронізації процесу загоєння. Ми показали, що лікування рани з використанням Pg знижувало активність ММР-9 у 3,5 раза на 18-ту добу лікування порівняно з вихідним значенням ($P<0,01$). Це означає, що ремоделювання тканини майже завершено, і висока активність ММП більше не потрібна.

Механізм дії Pg при хронічних ранових процесах полягає, в першу чергу, у ліквідації тканинної гіпоксії шляхом розчинення мікротромбів у судинах за рахунок своїх фібринолітичних властивостей. Процес переходу плазміногену у плазмін супроводжується підвищеною активністю прозапальних цитокінів, які містяться в тканинах ран. Експресія даних факторів ініціює запалення та стимулює ангіогенез, який є основною складовою для подолання «порочного круга» хронічного запалення та переходу ранового процесу на іншу стадію загоєння ран - стадію проліферації.

Застосування автологічного плазміногену дозволило каталізувати процеси загоєння у хронічних діабетичних ранах та дозволити рановому процесу, після нетривалої стадії загострення перейти до наступного етапу загоєння ран із утворенням грануляційної тканини, що характеризує проліферацію ранової поверхні.

У середньому повне закриття необроблених Pg ран (контрольна група) досягалося протягом 120 ± 17 днів, тоді як закриття рани після місцевого застосування Pg спостерігалося через 24 ± 4 дні ($P<0,01$).

Постійний моніторинг розміру рани за допомогою цифрової планіметрії виявив, що місцеве лікування Pg покращує загоєння та значно прискорює швидкість загоєння рани порівняно з пацієнтами, які отримували лікування за стандартизованими протоколами

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено теоретичне узагальнення та надано новий підхід для вирішення наукової задачі щодо поліпшення результатів патогенетичного лікування синдрому діабетичної стопи (СДС). Це базується на вивченні комплексної взаємодії аплікацій автологічного плазміногену, аналізі клінічних, біохімічних та мікробіологічних показників перебігу хронічних ран. Також досліджено та моніторено біохімічні зміни у активності цитокінів, а також визначено вплив даного методу на результати хірургічного лікування зазначеної патології.

1. Використання аплікацій автологічного Pg в комплексному лікуванні хронічних ран у хворих на СДС спричиняє місцеву та системну дію, що дозволяє стабілізувати перебіг ранового процесу, стимулювати регенераторні процеси, ліквідувати прояви «хронізації» рани та в коротші терміни підготувати рану до закриття одним із методів пластичної хірургії, або створити умови для самостійної епітелізації ран.
2. При дослідженні експресії регуляторів гіпоксії, ангіогенезу та аутофагії разом із активністю матриксних металопротеїназ у біоптатах тканин діабетичних ран та порівнянні із експресією даних цитокинів і їх активністю в гострих ранах за умов нормоглікемії встановлено: що експресія центрального регулятора гіпоксій-асоційованих процесів HIF-1α в діабетичних ранах була підвищена у 4,4 раза порівняно з значеннями в гострих ранах ($P<0,01$); рівень експресії VEGF в гострих ранах у 2 рази вище ніж у діабетичних ранах ($P<0,05$); загальний вміст ангіостатину у діабетичних хронічних ранах перевищував у 2,5 рази порівняно із гострими ранами ($P<0,05$); гострі рани містять слідові кількості активної ізоформи ММР-9, тоді як рясність активності ММР-9 визначена у діабетичних ранах.

3. Встановлено, що лікування автологічним Pg знижувало експресію центрального регулятора гіпоксій-асоційованих процесів HIF-1α у 6,3 раза порівняно з вихідним значенням (P<0,01), зменшувало загальний вміст ангіостатину на 18-й день у 2,5 раза порівняно з вихідним рівнем (P<0,05), водночас збільшуючи експресію VEGF у біоптатах рани в 1,9 раза (P<0,05); результати кількісного аналізу білка LC3, пов'язаного з аутофагією, у дермальних біоптатах демонструють, що додавання Pg призвело до зниження співвідношення LC3-II/LC3-I на 18-й день лікування (у 8,6 разів, P<0,05); лікування рани з використанням Pg знижувало активність MMP-9 у 3,5 раза на 18-ту добу лікування порівняно з вихідним значенням (P<0,01).
4. Лікування ран автологічним призводить до загострення запального процесу всередині рани та появи перифокальної реакції на 2-4 добу. У подальшому рановий процес переходить у проліферативну фазу із появами грануляційної тканини на 8-10 добу. Реалізація ранового процесу закінчується повною епітелізацією рани без утворення патологічного рубцювання. У середньому повне закриття необроблених Pg ран (контрольна група) досягалося протягом 120 ± 17 днів, тоді як закриття рани після місцевого застосування Pg спостерігалося через 24 ± 4 дні (P<0,01).
5. Застосування аплікацій автологічного Pg дозволяє модулювати надмірну активність ММП, створити сприятливі умови для загоєння шляхом покращення кровопостачання та усунення запальних процесів. Дана лікувальна тактика дозволяє підготувати ранову поверхню до пластичного закриття. Об'єктивними критеріями готовності рани до проведення автодермопластики слугують: наявність грануляцій та крайової епітелізації, відсутність бактеріального осіменіння, наявна контракція ранової поверхні, що корелює із мінімальною активністю тканинних протеаз.

6. Встановлено, що місцеве застосування Pg, отриманого з плазми, має виражений регенеративний ефект та сприяє загоєнню виразки стопи у пацієнтів з діабетом. Pg може прискорити швидкість загоєння ран шляхом запобігання шкірної гіпоксії, зменшення потоку аутофагії, зменшення надмірної активності MMP та посилення ангіогенної відповіді в тканині ранової області. Місцеві добавки Pg представляють собою багатообіцяючу стратегію для розробки нових терапевтичних підходів, які покращують загоєння ран у пацієнтів з діабетом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ahmad Sharoni, Siti K., Mohamed N. Mohd Razi, Nor F. Abdul Rashid, and Yusuf E. Mahmood. Self-efficacy of foot care behaviour of elderly patients with diabetes. Malaysian Family Physician. 2017. 12: 2–8. [Google Scholar] [PubMed]
2. Ajjan A,Gamlen T, Kristina F, et al. Diabetes is associated with posttranslational modifications in plasminogen resulting in reduced plasmin generation and enzyme-specific activity. Blood. 2013; 122(1): 134-142.DOI: 10.1182/blood-2013-04-494641
3. Al Ayed, Mousab, Mutasem Ababneh, Asirvatham Alwin Robert, Nasser Al Misfer, Maria Cruz, Hesiel C. Austria, and Mohamed Al Dawish. Factors Associated with Health-Related Quality of Life in Patients With Diabetic Foot Ulcer: A Cross-Sectional Study From Saudi Arabia. Cureus. 2020.12: e8658. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. Al Kayal T, Buscemi M, Cavallo A, Foffa I, Soldani G, Losi P. Plasminogen-Loaded Fibrin Scaffold as Drug Delivery System for Wound Healing Applications. Pharmaceutics. 2022; 14(2):251. DOI:10.3390/pharmaceutics14020251
5. Alice Alegria-Schaffer.Chapter Nineteen - Western Blotting using Chemiluminescent Substrates. Methods in Enzymology. 2014. Volume 541, Pages 251-259. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.000197
6. Rainha J, Stephen A Goutman, Brian C Callaghan.Painful diabetic neuropathy BMJ 2014; 348 doi:https://doi.org/10.1136/bmj.g1799
7. Amin, Leila, Baiju R. Shah, Arlene S. Bierman, Lorraine L. Lipscombe, Caixia F. Wu, Denise S. Feig, and Gillian L. Booth.

Gender differences in the impact of poverty on health: Disparities in risk of diabetes-related amputation. Diabetic Medicine. 2014. 31: 1410–17. [Google Scholar] [CrossRef]

8. Amy Bradshaw Kaiser, Nicole Zhang, Wouter van Der Pluijm. Global Prevalence of Type 2 Diabetes over the Next Ten Years (2018-2028)Diabetes 2018;67(Supplement_1):202-LB https://doi.org/10.2337/db18-202-LB
9. Andrea B. Rosskopf, Christos Loupatatzis, Christian W. A. Pfirrmann, Thomas Böni & Martin C. Berli.The Charcot foot: a pictorial review. Insights into Imaging (2019). https://doi.org/10.1186/s13244-019-0768-9
10. Andrew J.M. Boulton, David G. Armstrong, Robert S. Kirsner. Diagnosis and Management of Diabetic Foot Complications. Clinical Compendia Volume 2018, Issue 2.October 2018.https://doi.org/10.2337/db20182-1
11. Anne Lejay , Fei Fang , Rohan John , at all. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Volume 91, February 2016, Pages 11-22 https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.020
12. Anton J, G Horrevoets. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1): in vitro activities and clinical relevance.J. Haemotology.2004;125(1):12–23. Doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04844.x.
13. Antoniades C. Effects of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms on Oxidative Stress, Inflammatory Status, and Coronary Atherosclerosis: An Example of a Transient Phenotype. JACC Journals 2007 Mar, 49 (11) 1226. https://www.jacc.org/doi/full/10.1016/j.jacc.2006.12.029
14. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate

regulation of gene expression at the post-transcriptional level. Nucleic Acids Res. 2013 Sep;41(17):7997-8010.

15. Bai Q, Gao Q, Hu F, Zheng C, Sun N et al. Reoxygenation modulates the adverse effects of hypoxia on wound repair. Int J Mol Sci. 2022; 23 (24): 15832. https://doi.org/10.3390/ijms232415832
16. Bezrodny B.G., M.O. Prystupyuk,L.D. Duration of Hospital Treatment of Patients with Diabetes Mellitus Type 2 and Diabetic Foot Syndrome Depending on Compensation of Carbohydrate Metabolism.International Journal of Endocrinology (Ukraine).No. 4.60 (2014). https://doi.org/10.22141/2224-0721.4.60.2014.76681
17. Bishop A.. Role of oxygen in wound healing. Journal of Wound Care. 2013.Vol. 17, No. 9.https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.9.30937
18. Bull RH, Staines KL, Collarte AJ, Bain DS, Ivins NM et al. Measuring progress to healing: a challenge and an opportunity. Int Wound J. 2022; 19 (4): 734-740. https://doi.org/10.1111/iwj.13669.
19. Brem H., M. S. Golinko, O. Stojadinovic, et al.Primari cultured fibroblasts derived from patients with chronic wounds: a methodology to produce human cell lines and test putative growth factor therapy such as GMCSF. J. Transl. Med. – 2008. – Vol. 6. – P. 75–76. doi:10.1186/1479-5876-6-75
20. Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. J Immunol. 2013; 190(4): 1746-1757.
21. Bryk-Wiązania AH, Undas A. Hypofibrinolysis in type 2 diabetes and its clinical implications: from mechanisms to pharmacological modulation. Cardiovasc Diabetol. 2021; 20 (1): 191. https://doi.org/10.1186/s12933-021-01372-w
22. Buchanan, Patrick J. MD; Kung, Theodore A. MD; Cederna, Paul S. MD Evidence-Based Medicine: Wound Closure. Plastic and

Reconstructive Surgery 138(3S):p 257S-270S, September 2016. | DOI:10.1097/PRS.0000000000002775

23. Bus, Sicco A. PhD.The Role of Pressure Offloading on Diabetic Foot Ulcer Healing and Prevention of Recurrence.Plastic and Reconstructive Surgery 138(3S):p 179S-187S, September 2016. DOI:10.1097/PRS.0000000000002686

24. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. Diabetologia. 2021; 64 (4): 709-716. https://doi.org/10.1007/s00125-021-05380-z

25. Chabbert-Buffet N., LeDevehat C., Khodabandhelou N., et al. Evidence for associated cutaneous microangiopathy in diabetic patients with neuropathic foot ulceration . Diabetes Care. – 2003. – Vol. 26, № 3. – P. 960–961. DOI:10.2337/diacare.26.3.960

26. Chen A.H., S.G. Frangos, S. Kilaru, B.E. Sumpio. Intermittent Pneumatic Compression Devices – Physiological Mechanisms of Action. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery . May 2001, Volume 21, Issue 5, Pages 383-392 https://doi.org/10.1053/ejvs.2001.1348

27. Chen YH, Wu HL, Chen CK, Huang YH, Yang BC et al. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 310 (3): 804-810. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.081

28. Cheng TL, Chen PK, Huang WK, Kuo CH, Cho CF et al. Plasminogen/thrombomodulin signaling enhances VEGF expression to promote cutaneous wound healing. J Mol Med (Berl). 2018; 96 (12): 1333-1344. https://doi.org/10.1007/s00109-018-1702-1

29. Chenyu Huang MD, PhD, Tripp Leavitt BA, BS, Lauren R. Bayer PA-C, Dennis P. Orgill MD, PhD .Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. Current Problems in Surgery Volume 51,

Issue 7, July 2014, Pages 301-331. https://doi.org/10.1067/j.cpsurg.2014.04.001

30. Chinmay Gandhi , Prameyratna Kadam , Venkateswarlu Kamepalli , Yugantara Kadam .PEDIS grading and its role in diabetic foot ulcer management. International Surgery Journal. July 2019 .Vol. 6 No. 7 . DOI: https://doi.org/10.18203/2349-2902.isj20192990
31. Cho N.H. , J.E. Shaw , S. Karuranga et all. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045.Diabetes Research and Clinical Practice Volume 138, April 2018, Pages 271-281. https://doi.org/10.1016/j.diabres.
32. Christa M. Stoscheck Quantitation of protein.Methods in Enzymology Volume 182, 1990, Pages 50-68. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P
33. Corey E. Tabit, William B. Chung, Naomi M. Hamburg & Joseph A. Vita. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2010. volume 11, pages61–74
34. Costa D, Ielapi N, Caprino F, Giannotta N, Sisinni A, et al. Social aspects of diabetic foot: a scoping review. Social Sciences 2022; 11 (4): 149. https://doi.org/10.3390/socsci11040149
35. Courtenay M, PhD RGN, J C T Church, MD FRCSE, and T J Ryan, DM FRCP . Larva therapy in wound management. The Royal Society of Medicine Volume 93, Issue 2.2000 https://doi.org/10.1177/014107680009300206
36. Dan Ziegler, Nikolaos Papanas, Oliver Schnell, Bich Dao Thi Nguyen, Khue Thy Nguyen, Kongkiat Kulkantrakorn, Chaicharn Deerochanawong.Current concepts in the management of diabetic polyneuropathy. JDI.12 September 2020 https://doi.org/10.1111/jdi.13401

37. Danielle Dixon & Michael Edmonds. Managing Diabetic Foot Ulcers: Pharmacotherapy for Wound Healing.Drugs volume 81, pages29–56 (2021). [Google Scholar] [PubMed]
38. David M. Walton , Stephen D. Minton , Alonzo D. Cook The potential of transdermal nitric oxide treatment for diabetic peripheral neuropathy and diabetic foot ulcers Diabetes & Metabolic Syndrome. Clinical Research & Reviews Volume 13, Issue 5, September–October 2019, Pages 3053-3056 https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.003
39. De Haro J. A prospective randomized controlled study with intermittent mechanical compression of the calf in patiants with claudication . Journal of Vascular and Endovascular Surgery. – 2010. – Vol. 51, № 4. – P. 857–862. https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.10.116
40. Delamaire M., D. Maugendre, M. Moreno [et al.]. Impaired leucocyte functions in diabetic: patients. Diabet. Med. – 1997. – Vol. 14,№ 1. – P. 29–34. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199701)14:1<29::AID-DIA300>3.0.CO;2-V
41. Demidova–Rice T. N., Hamblin M. R., Herman I. M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: 169 biology, causes and approaches to care. Adv. Skin Wound Care. 2012; 25(7): 304–314. DOI:10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.
42. Demir H., Yaray S., Kirnap M., Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. Journal of Rehabilitation Research and Development, cilt.41, sa.5, ss.721-727, 2004. Doi: 10.1682/jrrd.2003.08.0131
43. Díaz-García, D.; Filipová, A.; Garza-Veloz, I.; Martinez-Fierro, M.L. A Beginner’s Introduction to Skin Stem Cells and Wound Healing.

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11030. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

44. Draxler DF, Medcalf RL. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis? Transfus Med Rev. 2015; 29 (2): 102-109. https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2014.09.006

45. Drinkwater SL, Smith A, Sawyer BM, Burnand KG. Effect of venous ulcer exudates on angiogenesis in vitro. Br J Surg. 2002; 89 (6): 709-713. https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02085.x

46. Dumville J. C. ,S. Deshpande, S. O'Meara, K. Speak Foam dressings for healing diabetic foot ulcers.Cochrane Database of Systematic Reviews 2013, Issue 6. Art. No.: CD009111. DOI: 10.1002/14651858.CD009111.pub3.

47. Elina Zakin , Rory Abrams , David M. Simpson.Diabetic Neuropathy.Semin Neurol 2019; 39(05): 560-569 DOI: 10.1055/s-0039-1688978

48. Eming SA, Murray PJ, Pearce EJ. Metabolic orchestration of the wound healing response. Cell Metab. 2021; 33 (9): 1726-1743. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.017

49. Ennis WJ, Lee C, Gellada K, Corbiere TF, Koh TJ.Advanced Technologies to Improve Wound Healing: Electrical Stimulation, Vibration Therapy, and Ultrasound—What Is the Evidence? Plastic and Reconstructive Surgery. 2016 ; 138(3 Suppl):94S-104S. DOI:10.1097/PRS.0000000000002680

50. Enoch S. , PriceCellular P.E. Molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged [Електронний ресурс] . World Wide Wounds. – 2004. – Режим доступу : http: www. Worldwidewounds.com

51. Enzo Ballotta MD, Antonio Toniato MD, Giacomo Piatto MD, Franco Mazzalai MD, Giuseppe Da Giau MD.Lower extremity arterial

reconstruction for critical limb ischemia in diabetes. Journal of Vascular Surgery Volume 59, Issue 3, March 2014, Pages 708-719 https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.103

52. Eriksson P O, Li J, Ny T, Hellström S. Spontaneous development of otitis media in plasminogen-deficient mice. Int. J. Med. Microbiol. 2006; 296(7):501–509. DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.04.002

53. Eun Ae Kang ,Kyungdo Han ,Jaeyoung Chun. Increased Risk of Diabetes in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Nationwide Population-Based Study in Korea.J. Clin. Med. 2019, 8(3), 343; https://doi.org/10.3390/jcm8030343

54. Eva L. Feldman, Brian C. Callaghan, Rodica Pop-Busui, et all. Diabetic neuropathy.Nature Reviews Disease Primers volume 5, Article number: 41 (2019) https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1

55. Fallah M, Viklund E, Bäckman A, et al. Plasminogen is a master regulator and a potential drug candidate for the healing of radiation wounds. Cell Death Dis. 2020;11(3):201. Doi:10.1038/s4141902023970.

56. Francisco Javier, Álvaro-Afonso, Jose Luis Lázaro-Martínez, Yolanda García-Álvarez, and Nikolaos Papanas .Management of hard-to-heal diabetic foot ulcers: local use of autologous leucocytes, platelets and fibrin multi-layered patches (LeucoPatch). Ann Transl Med. 2018 Dec; 6(Suppl 2): S126. doi: 10.21037/atm.2018.12.44

57. Fu K, Zheng X, Chen Y, Wu L, Yang Z et al. Role of matrix metalloproteinases in diabetic foot ulcers: potential therapeutic targets. Front Pharmacol. 2022; 13: 1050630. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1050630

58. Gabison E , Chang JH, Hernández-Quintela E, et al. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. Experimental Eye Research. 2004; 78(3):579-589. DOI: 10.1016/j.exer.2003.09.005

59. Gabriella Deli; Edit Bosnyak; Gabriella Pusch; Samuel Komoly; Gergely Feher.Diabetic Neuropathies: Diagnosis and Management.Neuroendocrinology (2014) 98 (4): 267–280. https://doi.org/10.1159/000358728

60. Gallacher S.J. , G. Thomson, W. D. Fraser , et al. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control . Diabet. Med. – 1995. – Vol. 12, № 10. – P. 916–920. https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1995.tb00396.x

61. Ganesh, S., Don, K. R.; A., Jothi Priya. The Role of Matrix Metalloproteinases in Wound Healing. International Journal of Pharmaceutical Research (09752366) . 2020 Supplement2, p702-707. 6p. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

62. Gao Y, Luo C, Rui T, Fan Y, Yao Y et al. Autophagy inhibition facilitates wound closure partially dependent on the YAP/IL-33 signaling in a mouse model of skin wound healing. FASEB J. 2021; 35 (10): e21920. https://doi.org/10.1096/fj.202002623RRR

63. George Han , Roger Ceilley,Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments.Adv Ther (2017) 34:599–610. DOI10.1007/s12325-017-0478-y

64. Gibson D. J., G. Schulftz. Chronic wound diagnostic for matrix metalloproteinase . Woundhealing Southern Africa. – 2009. – Vol. 2, № 2 P. 68–70. https://hdl.handle.net/10520/EJC82752

65. Gillard J. A. , M. V. R. Reed, D. Buttle, et al. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase–2 and –9 and tissue inhibitor of metalloproteinase–1 during human dermal wound healing. Wound Rep. Reg. – 2004. – Vol. 12. – P. 295–304.https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.012314.x

66. Gogos C. A., S. Giali, F. Paliogianni, G. Dimitracopoulos, H. P. Bassaris & A. G. Vagenakis Interleukin-6 and C-reactive protein

as early markers of sepsis in patients with diabetic ketoacidosis or hyperosmosis . Diabetologia volume 44, pages1011–1014 (2001)

67. Gushiken LFS, Beserra FP, Bastos JK, Jackson CJ, Pellizzon CH. Cutaneous wound: an update from physiopathology to current therapies. Life (Basel) 2021; 11 (7): 665. https://doi.org/10.3390/life11070665

68. Haibo Deng, Binghui Li, Qian Shen et all. Mechanisms of diabetic foot ulceration: A review.Journal of Diabetes.Volume 15, Issue 4Apr 2023. Pages283-361. DOI: 10.1111/1753-0407.13372

69. Hajieh Shahbazian, Leila Yazdanpanah, and Seyed Mahmuod Latifi. Risk assessment of patients with diabetes for foot ulcers according to risk classification consensus of International Working Group on Diabetic Foot (IWGDF).Pak J Med Sci. 2013 May-Jun; 29(3): 730–734. doi:10.12669/pjms.293.3473

70. Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. FASEB J. 2002; 16 (13): 1802-1814. https://doi.org/10.1096/fj.02-0109fje

71. Han C, Barakat M, DiPietro LA. Angiogenesis in wound repair: too much of a good thing? Cold Spring Harb Perspect Biol. 2022; 14 (10): a041225. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041225

72. Heiner Claessen, Herve Avalosse, Joeri Guillaume, Maria Narres, Tatjana Kvitkina, et all.Decreasing rates of major lower-extremity amputation in people with diabetes but not in those without: a nationwide study in Belgium.Diabetologia.2018.61:1966–1977 https://doi.org/10.1007/s00125-018-4655-6

73. Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M. [et al.] Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases . Circ. J. – 2009. – Vol. 73, № 3. –P. 411–418.https://doi.org/10.1253/circj.CJ-08-1102

74. Hirsch T, Spielmann M, Zuhaili B, Koehler T, Fossum M, Steinau HU, Yao F, Steinstraesser L, Onderdonk AB, Eriksson E. Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. BMC Surg. 2008; 8:5.DOI: 10.1186/1471-2482-8-5

75. Holloway S., Harding K., Stechmiller J., Schultz G. Acute and Chronic Wound Healing. In Wound Care Essentials—Practice Principles, 3rd ed.; Baranoski, S., Ayello, E., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2011; pp. 83–100. [Google Scholar]

76. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014; 3 (5): 390-399. https://doi.org/10.1089/wound.2013.0520

77. IvanovaYu. V., O. M. Klimova, V. O. Prasol. et all. Plastic closure of wounds in patients with ischemic form of diabetic foot syndrome.Journal Medicni perspektivi. Vol. 23 No. 4(part1) (2018). DOI:https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.4(part1).145669

78. Jaap J. van Netten, Sicco A., et all. Definitions and criteria for diabetes-related foot disease (IWGDF 2023 update) Diabetes Metab Res Rev. 2023; https://doi.org/10.1002/dmrr.3654

79. Jacobson LK, Johnson MB, Dedhia RD, Niknam-Bienia S, Wong AK. Impaired wound healing after radiation therapy: a systematic review of pathogenesis and treatment. JPRAS Open. 2017; 13:92-105.

80. Jeffcoate W. J., P. Price, K. G. Harding. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers . Diabetes Metab. Res. Rev. –2004. – Vol. 20, Suppl. 1. – P. 78–89. https://doi.org/10.1002/dmrr.476

81. Jögi A, Rønø B, Lund IK, Nielsen BS, Ploug M et al. Neutralisation of uPA with a monoclonal antibody reduces plasmin formation and

delays skin wound healing in tPA-deficient mice. PLoS One. 2010; 5 (9): e12746. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012746

82. John P, Greer. Wintrobe's Clinical Hematology, 12-th Edition, Vol.1. Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 574 p.

83. Jonathan E. Shaw, M.R.C.P., Wei-Li Hsi, M.D., Ph.D., and Peter R. Cavanagh, The Mechanism of Plantar Unloading in Total Contact Casts: Implications for Design and Clinical Use American Orthopaedic Foot & Ankle Society Volume 18, Issue 12 1997 https://doi.org/10.1177/10711007970180121

84. Jonathan Zhang Ming Lim, Natasha Su Lynn Ng, and Cecil Thomas, et all. Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. Journal of the Royal Society of MedicineVolume 110, Issue 3, March 2017, Pages 104-109. https://doi.org/10.1177/0141076816688346

85. Jones, Christine M.; Rothermel, Alexis T.; Mackay, Donald R. Evidence-Based Medicine: Wound Management.Plastic and Reconstructive Surgery, Volume 140, Number 1, July 2017, pp. 201e-216e(16) DOI: https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000003486

86. Jørn Ditzel, M.D., Ph.D.Functional Microangiopathy in Diabetes Mellitus. Diabetes 1968;17(6):388–397 https://doi.org/10.2337/diab.17.6.388

87. Junren Chen,Siqi Qin,Shengmeng Liu, et all. Targeting matrix metalloproteases in diabetic wound healing Front. Immunol., 17 February 2023 Volume 14 - 2023 | https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1089001

88. Kaissar Yammine MD, MPH, PhD , Fady Hayek MD , Chahine Assi MD aA meta-analysis of mortality after minor amputation among patients with diabetes and/or peripheral vascular disease.Journal of Vascular Surgery.Volume 72, Issue 6, December 2020, Pages 2197-2207.https://doi.org/10.1016/j.jvs.2020.07.086

89. Kang S K, H Y Kim, G S Yun and J K Lee. Portable microwave air plasma device for wound healing. Plasma Sources Science and Technology, Volume 24, Number 3, 2015 . DOI 10.1088/0963-0252/24/3/035020

90. Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, et al. Lack of alpha2-antiplasmin improves cutaneous wound healing via over-released vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in wound lesions. J Thromb Haemost. 2006;4(7):1602-1610.DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01978.x

91. Kanno Y. The role of fibrinolytic regulators in vascular dysfunction of systemic sclerosis. Int J Mol Sci. 2019;20(3):619. DOI:10.3390/ijms20030619

92. Katherine E. Macdonald, et al.The microbiology of diabetic foot infections: a meta-analysis. BMC Infect Dis (2021) 21:770. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06516-7

93. Katherine M. Raspovic, Nicolaas C. Schaper, Catherine Gooday, et all.Diagnosis and treatment of active charcot neuro-osteoarthropathy in persons with diabetes mellitus: A systematic review. Diabetes/Metabolism Research and Reviews.14 May 2023. https://doi.org/10.1002/dmrr.3653

94. Ke Yang , Yue Wang , Yi-wei Li , et all Progress in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. Biomedicine & PharmacotherapyVolume 148, April 2022. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112717

95. Kian Bagheri, BA, Albert T. Anastasio, and Samuel B. Adams. Contemporary Review: The Use of Human Placental Tissues in Foot and Ankle Surgery. Foot & Ankle InternationalVolume 44, Issue 7, July 2023, Pages 675-686 https://doi.org/10.1177/10711007231171075

96. Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AA, Dudhipala N. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. Cells 2022; 11 (15): 2439. https://doi.org/10.3390/cells11152439

97. Kolosovych I.V., Hanol I.V. Hemocoagulation factors of hemorrhagic complications in acute pancreatitis. Фізіологічний журнал. 2022;68 (1): 56-61. http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/2640

98. Konstantinos P. Donas, Anne Sohr, Georgios A. Pitoulias, Fernando Alfonso & Giovanni Torsello. Long-Term Mortality of Matched Patients with Intermittent Claudication Treated by High-Dose Paclitaxel-Coated Balloon Versus Plain Balloon Angioplasty: A Real-World Study. CardioVascular and Interventional Radiology volume 43, pages2–7 (2020) [Google Scholar] [PubMed]

99. Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I. Matrix metalloproteinases: the sculptors of chronic cutaneous wounds. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017; 1864 (11 Pt B): 2220-2227. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.08.003

100. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature volume 227, pages680–685 (1970) [Google Scholar] [PubMed]

101. Laura Giurato, Marco Meloni, Valentina Izzo, and Luigi Uccioli . Osteomyelitis in diabetic foot: A comprehensive overview. World J Diabetes. 2017 Apr 15; 8(4): 135–142. doi: 10.4239/wjd.v8.i4.135

102. Leandro Ramos Silva, Giordano Masini Fernandes, et all. Natacha Ueda Morales,Results of One-Stage or Staged Amputations of Lower Limbs Consequent to Critical Limb Ischemia and Infection. Annals of Vascular Surgery Volume 46, January 2018, Pages 218-225. https://doi.org/10.1016/j.avsg.2017.06.144

103. Li M, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. The dual role of autophagy under hypoxia-involvement of interaction between autophagy and apoptosis. Apoptosis 2015; 20 (6): 769-77. https://doi.org/10.1007/s10495-015-1110-8

104. Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidine-rich glycoprotein. J Biol Chem. 1980; 255: 10214–10222.

105. Liu Y, Chen X, Fang Y, Yan Y, He B et al. Dynamic changes of autophagy during hypertrophic scar formation and the role of autophagy intervention. Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery, 2021; 3 (3): 113-122. https://doi.org/10.1016/j.cjprs.2021.09.001

106. Lo, Zhiwen J., Naren K. Surendra, Akshar Saxena, and Josip Car. 2021. Clinical and economic burden of diabetic foot ulcers: A 5-year longitudinal multi-ethnic cohort study from the tropics. International Wound Journal 18: 375–86. https://doi.org/10.1111/iwj.13540

107. Lopes, Geysa, Isaura Rolim, et all. Social representations on diabetic foot: Contributions to PHC in the Brazilian Northeast. Representações sociais sobre pé diabético: Contribuições para Atenção Primária à saúde no Nordeste brasileiro. Ciencia & Saude Coletiva . 2021.26: 1793–803. https://doi.org/10.1590/1413-81232021265.04702021

108. Lorena Urbanoa,Eliana Portillaa, Wilson Muñozc, Albert Hofmand,Carlos H. Sierra-Torresa. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in an adult population from Colombia.Arch. Cardiol. Méx. vol.88 no.2 https://doi.org/10.1016/j.acmx.2017.02.002

109. Luke Vierthaler , Peter W. Callas , Philip P. Goodney, et all. Determinants of survival and major amputation after peripheral endovascular intervention for critical limb ischemia. Journal of

Vascular Surgery.Volume 62, Issue 3, September 2015, Pages 655-664.e8. https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.04.391\

110. Lund LR, Green KA, Stoop AA, Ploug M, Almholt K et al. Plasminogen activation independent of uPA and tPA maintains wound healing in gene-deficient mice. EMBO J. 2006 ;25 (12): 2686-2697. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601173

111. Magliano DJ , Boyko EJ. IDF DIABETES ATLAS 10th edition Review from International Diabetes Federation, Brussels, 02 Aug 2022 PMID: 35914061

112. Mandal SK, Rao LV, Tran TT, Pendurthi UR. A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts. J Thromb Haemost. 2005; 3(1):163-169.DOI: 10.1111/j.1538-7836.2004.01054.x

113. Maoquan Li.Guidelines and standards for comprehensive clinical diagnosis and interventional treatment for diabetic foot in China. Journal of Interventional Medicine Volume 4, Issue 3, August 2021, Pages 117-129 https://doi.org/10.1016/j.jimed.2021.07.003

114. Maria Demetriou, MD, Nikolaos Papanas, MD, and Efstratios Maltezos, MD.Tissue and Swab Culture in Diabetic Foot Infections: Neuropathic Versus Neuroischemic Ulcers.The International Journal of Lower Extremity Wounds. May 9, 2013.Volume 12, Issue 2 https://doi.org/10.1177/1534734613481975

115. Maria Vittoria Arcidiacono, Alicia Traveset , Esther Rubinat et all Esther Rubinat bMicroangiopathy of large artery wall: A neglected complication of diabetes mellitus. Atherosclerosis Volume 228, Issue 1, May 2013, Pages 142-147. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.011

116. Martins V.L., Caley M., O'Toole E.A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. Cell Tissue Res. 2013, 351, 255–268. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

117. Matthew P. Petersen.Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. American Diabetes Association.Diabetes Care 2018;41(5):917–928 https://doi.org/10.2337/dci18-0007 PubMed: 29567642

118. Matthieu Roustit PharmD, PhD, Jordan Loader, Dimitrios Baltzis MD, PhD, Wanni Zhao MD, PhD & Aristidis Veves MD, DSc.Microvascular Changes in the Diabetic Foot.The Diabetic Foot .06 September 2018.pp 173–188 [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

119. McCarty SM, Percival SL. Proteases and delayed wound healing. Adv Wound Care. 2013; 2(8):438-447. DOI: 10.1089/wound.2012.0370

120. Meaume S, J Perez, V Rethore, G Sebbane, A Dompmartin, J M Bressieux, T Leguyadec, O Tacca, S Bohbot.Management of chronic wounds with an innovative absorbent wound dressing .J. Wound Care. 2012; 21(7):315–322. DOI: 10.12968/jowc.2012.21.7.315.

121. Mengxue Wang, Yun Liu Yin, Liang Keiji, Naruse Ken Takahashi. Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions—Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia–Reperfusion Injury Front. Cardiovasc. Med., 13 April 2021Volume 8 - 2021 | https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.649785

122. Michael A. Del Core, MD, Junho Ahn, BS and Dane K. Wukich, MD.The Evaluation and Treatment of Diabetic Foot Ulcers and Diabetic Foot Infections. Foot & Ankle OrthopaedicsVolume 3, Issue 3, July 2018. https://doi.org/10.1177/2473011418788864

123. Mohammad Zubair & Jamal Ahmad. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders volume 20, pages207–217 (2019)

124. Mohan V. K. Recombinant human epidermal growth factor (REGEN-D 150): effect on healing of diabetic foot ulcers . Diabetes Res. Clin.

Pract. – 2007. – Vol. 78, № 3. – P. 405–411 https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.06.004

125. Monavarian, M.; Kader, S.; Moeinzadeh, S.; Jabbari, E. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. Tissue Eng. Part B Rev. 2019, 25, 294–311. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0350
126. Morton L. M. &Phillips T. J. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis an devaluation of chronic wounds. J. Am. Acad. Dermatol. 2016; 74(4):589–605. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.08.068
127. Moxey P. W., P. Gogalniceanu, R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, K. J. Jones, M. M. Thompson, P. J. Holt Diabet. Lower extremity amputations — a review of global variability in incidence. Med. 09 March 2011 https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03279.x
128. Myung Shin Kang, Chong Hwa Kim.Management of Diabetic Peripheral Neuropathy.Korean J Med > Volume 89(3); 2015. DOI:https://doi.org/10.3904/kjm.2015.89.3.277
129. N. Katsilambros, E. Dounis, K. Makrilakis, N. Tentolouris, P. Tsapogas.Atlas of the diabetic foot .Wiley-Blackwell. 2010. – 249 p. DOI: 10.1002/9781444317589.
130. Nalini Singh, MD; David G. Armstrong, DPM, MSc, PhD; Benjamin A. Lipsky, MD . Preventing Foot Ulcersin Patients With Diabetes. JAMA. 2015-01-12.Vol. 293, iss. 2. P. 217–228. doi:10.1001/jama.293.2.217
131. Nicolaas C. Schaper, Jaap J. van Netten, Jan Apelqvist, et all. Practical Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease (IWGDF 2019 update).Diabetes/Metabolism Research and Reviews.16 March 2020 https://doi.org/10.1002/dmrr.3266
132. Noha Ahmed El Boghdady, Gamal Ali Badr. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy.Cell Biochemistry and Function. 07 February 2012 https://doi.org/10.1002/cbf.2808

133. Ny L, Parmer RJ, Shen Y, Holmberg S, Baik N et al. The plasminogen receptor, Plg-RKT, plays a role in inflammation and fibrinolysis during cutaneous wound healing in mice. Cell Death Dis. 2020; 11 (12): 1054. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03230-1

134. Ogurtsova K., J.D. da Rocha Fernandes a, Y. Huang, et all. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. Diabetes Research and Clinical Practice Volume 128, June 2017, Pages 40-50. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024

135. Okunishi K, Sisson TH, Huang SK, Hogaboam CM, Simon RH, Peters-Golden M. Plasmin overcomes resistance to prostaglandin E2 in fibrotic lung fibroblasts by reorganizing protein kinase A signaling. J Biol Chem. 2011;286(37):32231-32243

136. Olivier Garraud, Wael N. Hozzein & Gamal Badr.Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches? BMC Immunology volume 18, Article number: 23 (2017) DOI:10.1186/s12865-017-0207-y

137. Orgill, Dennis P. M.D., Ph.D.; Bayer, Lauren R. P.A.-C. Update on Negative-Pressure Wound Therapy. Plastic and Reconstructive Surgery 127():p 105S-115S, January 2011. DOI:10.1097/PRS.0b013e318200a427

138. Paolo Raggi , Jacques Genest , Jon T. Giles , et all. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. Atherosclerosis.Volume 276, September 2018, Pages 98-108. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.07.014

139. Patricia A.M. Snoek-van Beurden & Johannes W. Von den Hoff. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Biotechniques.Vol. 38, NO. 1 2018. https://doi.org/10.2144/05381RV01

140. Patrick J. Hennessey 1, Edward G. Ford 1, C. Thomas Black 1, Richard J. Andrassy Wound collagenase activity correlates

directly with collagen glycosylation. Journal of Pediatric Surgery.Volume 25, Issue 1, January 1990, Pages 75-78 https://doi.org/10.1016/S0022-3468(05)80167-8

141. Paul Browning.Modern management in acute wound care.British Journal of Healthcare ManagementVol. 23, No. 10. https://doi.org/10.12968/bjhc.2017.23.10.477

142. Peige Song, Diana Rudan, Yajie Zhu.Global, regional, and national prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2015: an updated systematic review and analysis.The Lancet Global Health. Volume 7, Issue 8, E1020-E1030, 2019. DOI:https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30255-4

143. Peter A. Blume,Ryan Donegan, Brian M. Schmidt. The Role of Plastic Surgery for Soft Tissue Coverage of the Diabetic Foot and Ankle. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery . Volume 31, ISSUE 1, P127-150, January 2014 DOI:https://doi.org/10.1016/j.cpm.2013.09.006

144. Petrenko OM, Tyhomyrov AA. Levels of angiogenic regulators and MMP-2, -9 activities in Martorell ulser: a case report. Ukrainian Biochemical Journal. 2019; 91(2): 100-107

145. Petrenko OM. Role of ultrasonic cavitation in complex treatment of suppurative-necrotic complications of diabetic foot syndrome. Klinichna Khirurhiia, 01 Jul 2015, (7):41-43 PMID: 26591218

146. Pinar Sen, Tuna Demirdal.Evaluation of mortality risk factors in diabetic foot infections.International Wound Journal. Volume 17, Issue 4Aug 2020. Pages869-1099.https://doi.org/10.1111/iwj.13343

147. Pitocco D., T. Spanu, M. Di Leo, et all. Diabetic foot infections: a comprehensive overview D. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2019; 23(2 Suppl.): 26-37

148. Poretsky, Leonid . Principles of Diabetes Mellitus (вид. 2nd) (2010). New York:Springer. ISBN 978-0-387-09840-1. doi:10.1007/978-0-387-09841-8.
149. Pramod Kumar,Echalasara Govindarama Padmanabha et all. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing.Plast Aesthet Sep 15, 2015.Res .Vol 2 .Issue 5 . [Downloaded free from http://www.parjournal.net on Thursday, September 17, 2015, IP: 5.156.76.39]
150. Qiu ZK, Zhang MZ, Zhang WC, Li ZJ, Si LB et al. Role of HIF-1α in pathogenic mechanisms of keloids. J Cosmet Dermatol. 2023. https://doi.org/10.1111/jocd.15601
151. Radi Noorsyawala,Fahmi Jaka Yusufa, Kemas Dahlan, Ratna Maila Dewib. PEDIS Classification in Diabetic Foot Ulcers Patients. Journal of Indonesian Society for Vascular and Endovascular Surgery Vol. 1, No. 2, June 2020. pISSN 2715-1204 - eISSN 2715-1239
152. Rainha J., Souza , Aaron de Souza , Meera D. Nagvekar. Nerve conduction studies in diabetics presymptomatic and symptomatic for diabetic polyneuropathy.Journal of Diabetes and its Complications Volume 29, Issue 6, August 2015, Pages 811-817. https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.05.009
153. Ramakant P., A. K. Verma, R. Misra, K. N. Prasad, G. Chand, A. Mishra, G. Agarwal, A. Agarwal & S. K. Mishra. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? Diabetologia. 2011. volume 54, pages58–64. https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-010-1893-7
154. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. J Investig Dermatol Symp Proc. 2000; 5 (1): 47-54. https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00004.x

155. Rebalka IA, Raleigh MJ, D'Souza DM, Coleman SK, Rebalka AN, Hawke TJ. Inhibition of PAI-1 Via PAI-039 Improves Dermal Wound Closure in Diabetes. Diabetes. 2015;64(7):2593-2602. DOI:10.2337/db14-1174

156. Ren H, Zhao F, Zhang Q, Huang X, Wang Z. Autophagy and skin wound healing. Burns Trauma. 2022;10: tkac003. https://doi.org/10.1093/burnst/tkac003

157. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. J. Cell Commun. Signal. 2016, 103–120. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed][Green Version]

158. Robert B. Diller andAaron J. Tabor . The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review.Biomimetics 2022, 7(3), 87; https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087

159. Robert G Frykberg, Gary W Gibbons, Jodi L Walters, Dane K Wukich, Farrell C Milstein . A prospective, multicentre, open-label, single-arm clinical trial for treatment of chronic complex diabetic foot wounds with exposed tendon and/or bone: positive clinical outcomes of viable cryopreserved human placental membrane. International Wound Journal 03 August 2016. https://doi.org/10.1111/iwj.12649

160. Rogers L. S., N. I. Bevilacqua. Organized programs to prevent lower-extremity amputations. J. Am. Podiatr. Med. Assoc. – 2010. – Vol. 100, № 2.– P. 101–104. https://doi.org/10.7547/1000101

161. Romer J, Bugge TH, Pyke C, et al. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. Nat Med. 1996;2(3):287-292. DOI:10.1038/nm0396-287

162. Rosalinda Madonna , Carmela Rita Balistreri , Yong-Jian Geng , Raffaele De Caterina.Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches.Vascular Pharmacology Volume 90, March 2017, Pages 1-7. https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.01.004

163. Roth D, Piekarek M, Paulsson M, et al. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. Am J Pathol. 2006;168(2):670-684.).DOI: 10.2353/ajpath.2006.050372

164. Ruilong Zhao ,Helena Liang ,Elizabeth Clarke ,Christopher Jackson and Meilang Xue. Inflammation in Chronic Wounds.Int. J. Mol. Sci. 2016, 17(12), 2085; https://doi.org/10.3390/ijms17122085

165. Saba Noor , Rizwan Ullah Khan , Jamal Ahmad. Understanding Diabetic Foot Infection and its Management. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews Volume 11, Issue 2, April–June 2017, Pages 149-156 https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.06.023

166. Safi U., Khan, Hammad Rahman, et all. Association of Lowering Low-Density Lipoprotein Cholesterol With Contemporary Lipid-Lowering Therapies and Risk of Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of the American Heart Association.2 Mar 2019. https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011581

167. Saksela, O.; Rifkin, B. Cell-Associated Plasminogen Activation: Regulation and Physiological Functions. Ann. Rev. Cell. Biol. 1988; 4: 93–126. Doi: 10.1146/annurev.cb.04.110188.000521.

168. Sanderson-Smith ML, De Oliveira DM, Ranson M, McArthur JD. Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. Journal of Biomedicine and Biotechnology.Volume 2012, Article ID 272148, 14 pages. doi:10.1155/2012/272148

169. Sarah Brown, Jane Nixon, Myka Ransom, et all.Multiple Interventions for Diabetic Foot Ulcer Treatment Trial (MIDFUT): study protocol for a randomised controlled trial. BMJ Journals.19 April 2020 http://orcid.org/0000-0002-1840-3786

170. Schäfer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD. Plasminogen activation in healing human wounds. Am J Pathol. 1994;144(6):1269-1280.

171. Scott R. Levin, Nkiruka Arinze, Jeffrey J. Lower extremity critical limb ischemia: A review of clinical features and management. Siracuse Trends in Cardiovascular Medicine Volume 30, Issue 3, April 2020, Pages 125-130 https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.04.002

172. Sharma MR, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiostatin-induced inhibition of endothelial cell proliferation/apoptosis is associated with the down-regulation of cell cycle regulatory protein cdk5. J Cell Biochem. 2004; 91 (2): 398-409. https://doi.org/10.1002/jcb.10762

173. Shen Y, Guo Y, Mikus P, Sulniute R, Wilczynska M, Ny T, Li J. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. Blood. 2012;119(24):5879-5887. DOI: 10.1182/blood-2012-01-407825

174. Shen Y, Guo Y, Wilczynska M, Li J, Hellström S et al. Plasminogen initiates and potentiates the healing of acute and chronic tympanic membrane perforations in mice. J Transl Med. 2014; 12: 5. https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-5

175. Shi J, Shi S, Wu B, Zhang J, Li Y et al. Autophagy protein LC3 regulates the fibrosis of hypertrophic scar by controlling Bcl-xL in dermal fibroblasts. Oncotarget 2017; 8 (55): 93757-93770. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20771

176. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. BMB Rep. 2008 Apr 30;41(4):278-86. DOI:https://doi.org/10.1074/jbc.M301410200

177. Sicco A. Bus, Jaap J., Van Netten, et all.Standards for the development and methodology of the 2019 International Working Group on the Diabetic Foot guidelines. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 09 January 2020. https://doi.org/10.1002/dmrr.3267

178. Simona Federica Spampinato,Grazia Ilaria Caruso,Rocco De Pasquale, Maria Angela Sortino and Sara Merlo. The Treatment of Impaired

Wound Healing in Diabetes: Looking among Old Drugs. Pharmaceuticals 2020, 13(4), 60. https://doi.org/10.3390/ph13040060

179. Siqueira M. F., J. Li, L. Chehab , et al. 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).Diabetologia. – 2010. –Vol. 53, № 2. – P. 378–388. https://doi.org/10.1007/s00125-009-1529-y

180. Smith E, Hoffman R. Multiple fragments related to angiostatin and endostatin in fluid from venous leg ulcers. Wound Repair Regen. 2005; 13 (2): 148-57. https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005

181. Spravchikov N., G. Sizyakov, M. Gartsbein, et al. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications . Diabetes. –2001. – Vol 50, № 7. – P. 1627–1635. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.7.1627

182. Steve Duff, Michael S Mafilios,Prajakta Bhounsule,James T Hasegawa.The burden of critical limb ischemia: a review of recent literature.Vascular Health and Risk Management Volume 15, 2019. Issue.https://doi.org/10.2147/VHRM.S209241

183. Sugimoto MA, Ribeiro ALC, Costa BRC, et al. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. Blood 2017; 129 (21): 2896-2907. https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825

184. Sulniute R, Shen Y, Guo YZ, et all. Plasminogen is a critical regulator of cutaneous wound healing. Thromb Haemost. 2016;115(5):1001-1009. DOI: 10.1160/TH15-08-0653

185. Suzuki K., G. Michael, Y. Tamire .Viable intact cryopreserved human placental membrane for a non-surgical approach to closure in complex wounds. Journal of Wound CareVol. 25, No. Sup10 2016. https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.Sup10.S25

186. Szabo I, Simon M Jr, Hunyadi J. Plasmin promotes keratinocyte migration and phagocytic-killing accompanied by suppression of cell proliferation which may facilitate re-epithelialization of wound beds. Clin Dev Immunol. 2004;11(3-4):233-240. DOI:10.1080/17402520400001710

187. Tottoli, E.M.; Dorati, R.; Genta, I.; Chiesa, E.; Pisani, S.; Conti, B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. Pharmaceutics 2020, 12, 735. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735

188. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4350-4354.

189. Tsai SH, Huang PH, Hsu YJ, Peng YJ, Lee CH et al. Inhibition of hypoxia inducible factor-1α attenuates abdominal aortic aneurysm progression through the down-regulation of matrix metalloproteinases. Sci Rep. 2016; 6: 28612. https://doi.org/10.1038/srep28612

190. Twining SS, Wilson PM, Ngamkitidechakul C. Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1alpha and -1beta. Biochem J. 1999 May 1; 339 (Pt 3):705-12. PMID 10215610

191. Tykhomyrov AA, Yusova EI, Diordieva SI, Korsa VV, Grinenko TV. Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. Biotechnologia Acta. 2013; 6(1): 87-97.

192. Vandamme L., A. Heyneman 1, H. Hoeksema, J. Verbelen, S. Monstrey . Honey in modern wound care: A systematic review. Burns Volume 39, Issue 8, December 2013, Pages 1514-1525 https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.06.014

193. Wan Xing Hong, Michael S. Hu, Mikaela Esquivel, et all.The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. Advances in Wound CareVol. 3, No. 5. 2014. https://doi.org/10.1089/wound.2013.0520

194. Wang, M.; Huang, X.; Zheng, H.; et all. Nanomaterials applied in wound healing: Mechanisms, limitations and perspectives. J. Control Release 2021, 337, 236–247. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.017

195. Warriner R. A., M. Cardinal. Human Fibroblast-Derived Dermal Substitute: Results from a Treatment Investigational Device Exemption (TIDE) Study in Diabetic Foot Ulcers. Adv. Skin Wound Care. – 2011. – Vol. 24,№ 7. – P. 306–311. DOI:10.1097/01.ASW.0000399647.80210.61

196. Watelet J. B., C. Claeys, P. V. Cauwenberge, C. Bachert. Predictive and monitoring value of matrix metalloproteinase–9 for healing quality after sinus surgery. Wound Rep. Reg. – 2004. – Vol. 12, № 4. – P. 412–418 https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.012411.x

197. Wenjian Liu, Yu Yuan & Dewu Liu . Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Stem Cells Promote Diabetic Wound Healing via the PI3K-AKT-mTOR-HIF-1α Signaling Pathway. Tissue Engineering and Regenerative Medicine volume 18, pages1035–1044 (2021) [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed][Green Version]

198. Westby MJ, Norman G, Watson REB, Cullum NA, Dumville JC. Protease activity as a prognostic factor for wound healing in complex wounds. Wound Repair Regen. 2020; 28(5): 631-644. DOI:10.1111/wrr.12835

199. Yiling Liu, Yan Shi, Junyou Zhu, et all. Study on the Effect of the Five-in-One Comprehensive Limb Salvage Technologies of Treating Severe Diabetic Foot . Advances in Wound CareVol. 9, No. 12 30 Oct2020. https://doi.org/10.1089/wound.2018.0903

200. Yoshikai Fujita,Tatsufumi Murakami and Akihiro Nakamura. Recent Advances in Biomarkers and Regenerative Medicine for Diabetic Neuropathy.J. Mol. Sci. 2021, 22(5), 2301; https://doi.org/10.3390/ijms22052301

201. Zerina Lokmic , James Musyoka , Timothy D. Hewitson , Ian A. Darby Chapter three - Hypoxia and Hypoxia Signaling in Tissue Repair and Fibrosis. International Review of Cell and Molecular Biology.Volume 296, 2012, Pages 139-185. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394307-1.00003-5

202. Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnes TC, Loskutoff DJ, Parmer RJ, Miles LA.Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. Thromb Haemost. 2002 Mar; 87(3):493-501. DOI: 10.1055/s-0037-1613030

203. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y.Global epidemiology of diabetic foot ulceration: A systematic review and meta-analysis. Ann Med. 2017 Mar;49(2):106-116. doi: 10.1080/07853890.2016.1231932

204. Антощук Р. Я., Дзюбановський І. Я., Продан А. М. Ангіосонографічні паралелі діагностики ураження артеріальної системи у пацієнтів із гнійно-некротичними ускладненнями синдрому діабетичної стопи Вісник медичних і біологічних досліджень. 3(5),2020. DOI:10.11603/bmbr.2706-6290.2020.3.11416

205. Бєсєдін О.М., Косульников С.О.,Тарнапольський С.О., Кравченко К.В., Карпенко С.І. Опороформувальні остеокорегувальні оперативні втручання у хворих із синдромом діабетичної стопи. Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія, № 4 (64). pp. 24-28. ISSN 2519-2582. DOI:https://doi.org/10.24026/18181384.4(64).2018.149981

206. Василюк С.М., Шевчук А.Г., Федорченко В.М., Осадець В.С., Кримець С.А., Василюк А.С. Синдром діабетичної стопи. діабетична периферійна невропатія.Art of medicine. 1(9)січень-березень, 2019. DOI: 10.21802/artm.2019.1.9.21

207. Воловар О.С., Астапенко О.О., Литовченко Н.М., Паливода Р.С. Загоєння ран та регенерація м’яких тканин. Літературний огляд.

Буковинський медичний вісник. 2023. Т. 27, № 3 (107). DOI:https://doi.org/10.24061/2413-0737.27.3.107.2023.17

208. Гаврецький А.І. Особливості біомеханіки стопи у хворих з цукровим діабетом та обґрунтування застосування іммобілізуючих розвантажувальни хпов'язок(оглядлітератури). Військова медицина україни . (4.2019, Том 19)DOI: 10.32751/2663-0761-2019-04-10

209. Гольцев К. А.,Криворучко І. А.,Чеверда В. М. Особливости патогенезу гнійних ран нижніх кінцівок, що тривало не загоюються. Kharkiv surgical school. № 1–2 (118–119) 2023 DOI:https://doi.org/10.37699/2308-7005.1-2.2023.32

210. Гончар М.Г. , та інші. Комплексне лікування синдрому діабетичної стопи. Клінічна анатомія та оперативна хірургія – Т. 18, № 4 – 2019 . DOI: 10.24061/1727-0847.18.4.2019.15

211. Граматюк С. М., та інші. Експериментальна оцінка і порівняльний аналіз ефективності модифікованого методу клітинної терапії хронічних ран на тлі цукрового діабету. Klinichna Khirurhiia. 2021 November/December; 88(11-12). DOI:10.26779/25221396.2021.1112.68

212. Діденко С. М. Пластичне закриття виразково–некротичних уражень м'яких тканин стопи у хворих з ішемічною формою синдрому діабетичної стопи. Klinichna khirurhiia. 2018 June; 85(6). DOI:10.26779/2522-1396.2018.06.40

213. Діденко С. М. Морфометричні дослідження кровоносних судин шкіри та м'язів у хворих з ішемічною формою синдрому діабетичної стопи. Klinichna khirurhiia. 2018 August; 85(8) DOI:10.26779/25221396.2018.08.33

214. Діденко С. М., та інші.Зміни судин мікроциркуляторного русла шкіри та м'язів у хворих з ішемічною формою синдрому

діабетичної стопи. Klinichna khirurhiia. 2018 March; 85(3). DOI:10.26779/25221396.2018.03.35

215. Іваненко Ю.О., Калмиков С.А., Калмикова Ю.С. Основні підходи до немедикаментозного та відновноголікування хворих на цукровий діабет 2 типу. Фізична реабілітація та рекреаційно-оздоровчі технології No 5(1) / 2020. DOI:https://doi.org/10.15391/prrht.20205(1).03

216. Кизименко О.О., Городова-Андрєєва Т.В., Ляховський В.І. Сучасні підходи до лікування хворих з гнійно-некротичними ураженнями синдрому діабетичної стопи.Світ медицини та біології. 2018. № 2(64). DOI:10.26724/207983342018-2-64-209-213

217. Козловська І. М.,Іфтодій А. Г., Кулачек Я. В.,Гребенюк В. І., Ковтюк Н. І. Застосування вакуумної терапії за умови комплексного лікування ускладнених форм синдрому діабетичної стопи . Kharkiv surgical school.№ 3-4(96-97) 2019. DOI:https://doi.org/10.37699/23087005.3-4.2019.17

218. Колісник П. Ф., та інші.Застосування озонотерапії в лікуванні трофічних діабетичних виразок нижніх кінцівок. “Вісник Вінницького національного медичного університету”, 2020, Т. 24, №1. DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-18

219. Кравець О.В., Шкатула Ю.В., Щербак Б.І., Кравець В.В. Лікування та реабілітація пацієнтів із гнійно-некротичними ускладненнями синдрому діабетичної стопи. Укр. мед. часопис, 5 (133), Т. 2 – IX/X 2019 DOI:10.32471/umj.16803051.133.163607

220. Кравчун Н.А. Вміст у сировідці крові інгібітора плазміногена-1 у хворих на цукровий діабет активатора плазміногену-1 у хворих на цукровий діабетом 2 типу. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна № 738. 2006.

221. Краснов О. Г., та інші.Удосконалення органозберігаючого лікування синдрому діабетичної стопи з урахуванням

особливостей перебігу ранового процесу. Клінічна хірургія. 2015. №11.2. http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/2543

222. Мироненко О. І, Натрус Л. В., Панова Т. І., Верьовка С. В.Вплив мікробних протеаз на активність матриксних металопротеїназ та показники окисного стресу ранової тканини щурів з експериментальним цукровим діабетом. Biopolym. Cell. 2020; 36(4):313-325. DOI:http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A35

223. Пиптюк О. В., С. Б. Телемуха, В. О. Пиптюк. Алгоритми лікування гнійно-некротичних процесів при синдромі діабетичної стопи . Галицький лікарський вісник. - 2016. - Т. 23, число 3(2). - С. 118-121. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/glv_2016_23_3%282%29__45

224. Покидько М. І., Зарезенко Т. П., Філіппов С. В., Балабуєва В. В., Осадчий А. В.Порівняльний аналіз методів оцінки розмірів ранового дефекту при гнійно–запальних захворюваннях м'яких тканин. Klinichna khirurhiia. 2019 November; 86(11.2). URI:https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/5349

225. Польовий В. П., на інші. Індивідуалізована хірургічна тактика при синдромі діабетичної стопи. Шпитальна Хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука. 2020. No4 ISSN 1681–2778. DOI10.11603/2414-4533.2020.4.11782

226. Рибалка Я.В.Застосування prp-терапії в комплексі передопераційної підготовки до аутодермопластики при лікуванні хронічних ран. ВІСНИК ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».2018.Том 18, Випуск 1 (61)

227. Савка І. І. Савка Т. Б.Механізми змін структурної організації органів та їх судин за умов цукрового діабету. Український журнал медицини, біології та спорту – 2020 – Том 5, № 2 (24) DOI:10.26693/jmbs05.02.036

228. Савка І.І. , Цитовський М.Н. , Дмитрів Г.Д. Макро-, мікро- та ультрамікроскопічні зміни органів при цукровому діабеті. Morphologia.2021. Том 15.No3 DOI:https://doi.org/10.26641/19979665.2021.3.23-29
229. Слободяник С. В., Хіміч С. Д., Школьніков В. С. Проблема хронічних ран та можливість застосування мезенхімальних стовбурових клітин при їх лікуванні. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2020.Т. 24, №3 ISSN 1817-7883 eISSN 2522-9354 DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(3)-24
230. Тамм Т. І., М. С. Попов, З. І. Базаринская. Особливості хірургічного лікування деформацій у хворих із нейропатичною формою синдрому діабетичної стопи. Шпитальна хірургія. - 2014. - № 3. - С. 48-50. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/shpkhir_2014_3_13
231. Тронько Н.Д., Соколова Л.К., Ковзун Е.І., Пастер І.П. Клінічні дослідження з використання стовбурових клітин у лікуванні пацієнтів із синдромом діабетичної стопи згідно з базою даних сайту ClinicalTrials.gov. Ендокринологія. Том 25 № 3 (2020). DOI:https://doi.org/10.31793/1680-1466.2020.25-3.251
232. Фундюр В.Д., та інші. Особливості виконання органозберігаючої ампутації стопи, поєднаної з регіональною озонотерапією, локальним застосуванням аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, та вакуумною санацією післяопераційної рани у хворих на ішемічно-гангренозну форму синдрому діабетичної стопи. CLINICAL & EXPERIMENTAL PATHOLOGY. Т. XX, № 2 (76), 2021.
233. Шаповал С.Д., Савон І.Л., Трибушний О.В., Василевська Л.А., Слободченко Л.Ю., Єфіменко А.О. Характеристика мікробного пейзажу гнійних осередків у хворих на ускладнений синдром

діабетичної стопи у часовому аспекті. Клінічна анатомія та оперативна хірургія – Т. 18, № 4 – 2019. DOI:10.24061/17270847.18.4.2019.2

234. Якименко О. Г., ФіщукО. О., СучокС. О. Динамічна оцінка поширеності та глікемічний контроль цукрового діабету І типу серед дитячого населення.Дитяча хірургія. Україна.№ 4(73) (2021). DOI:https://doi.org/10.15574/PS.2021.73.100

Додаток №1 Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці , в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Петренко О.М. Бадзюх С.В. Тихомиров А.О. Особливості закриття ранових дефектів у пацієнтів із хронічними діабетичними ранами. Medical science of Ukraine / Медична наука україни, 2023, Vol. 19, № 4 DOI:https://doi.org/10.32345/2664-4738.4.2023.08
2. Бадзюх Сергій, Петренко Олег, Безродний Борис, Тихомиров Артем. Вплив аутологічного плазміногену на швидкість загоєння хронічних ран шкіри у пацієнтів з цукровим діабетом та рівень протеїнів – маркерів гіпоксії та ангіогенезу.Ukrainian Scientific Medical Youth Journal Issue 3 (141), 2023 DOI:https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.138-147
3. Petrenko O., Badziukh S., Tykhomyrov A.Plasminogen application improves plastic closure of wound defects in patients with chronic diabetic wounds. INTER COLLEGAS, Vol. 10, No.2 (2023) https://doi.org/10.35339/ic.10.2.pbt
4. О. М. Петренко,С. В. Бадзюх,А. О. Тихомиров.Особливості балансу основних регуляторів ангіогенезу й активність матриксних металопротеїназ -2, -9 у хронічних виразках пацієнтів з цукровим діабетом. Харківська хірургічна школа № 3 (120) 2023 DOI:https://doi.org/10.37699/23087005.3.2023.06
5. БадзюхС.В. Роль системи плазміноген/плазмін у загоєнні ран. Вісник проблем біології і медицини – 2022 – Вип. 4 (167) DOI:10.29254/20774214-2022-4-167-16-22