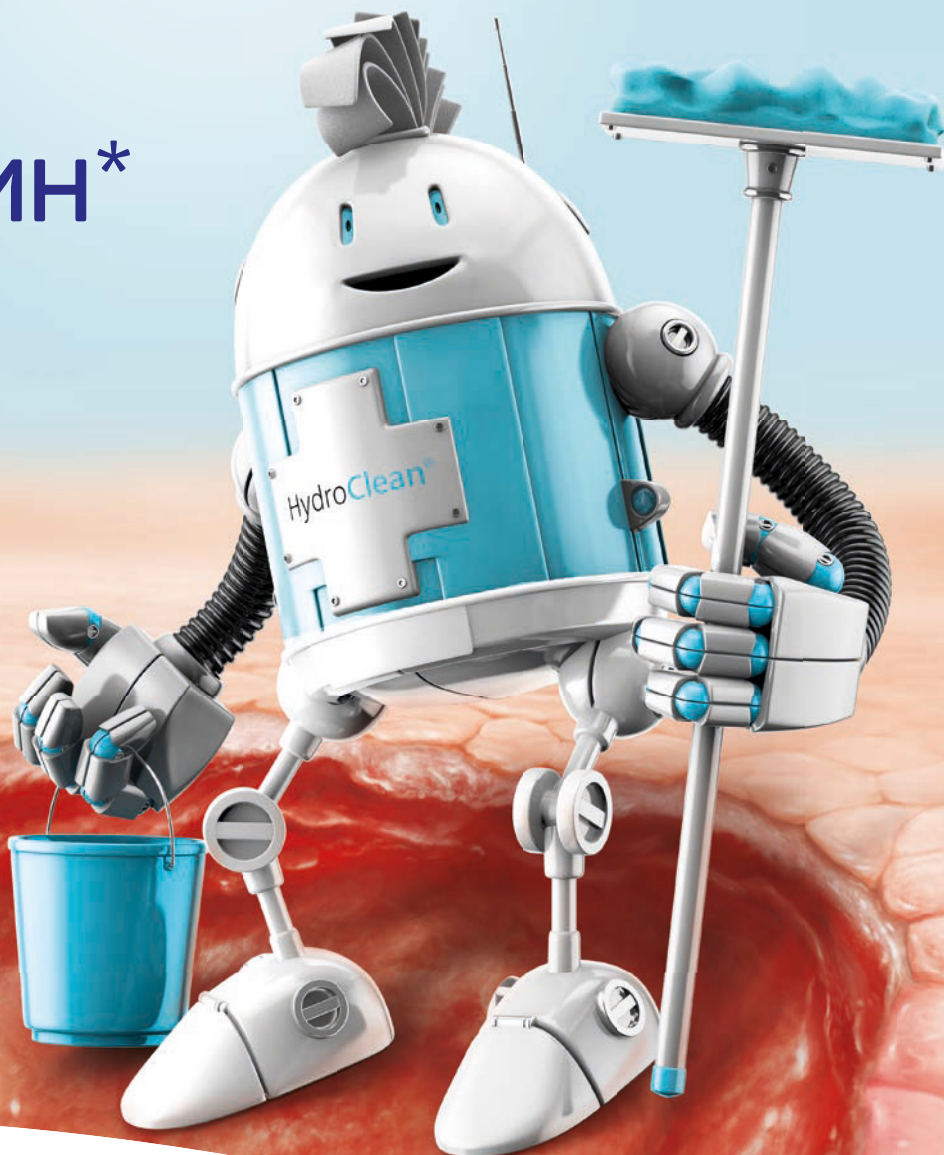


HARTMANN



Очищение раны и подготовка
раневого ложа

ГидроКлин*



Лонгитюдное исследование

для оценки уровней биомаркеров в раневых жидкостях венозных трофических язв нижних конечностей и ран донорского участка расщепленного кожного лоскута при использовании раневых повязок, модулирующих активность протеаз

Микосински Дж., Калогеропулос К., Бундгаард Л. с соавт. (2022 г.).

*HydroClean.

Предназначено для специалистов здравоохранения.
РУ №РЗН 2025/26243 от 29.09.2025 г.





Лонгитюдное исследование для оценки уровней биомаркеров в раневых жидкостях венозных трофических язв нижних конечностей и ран донорского участка расщепленного кожного лоскута при использовании раневых повязок, модулирующих активность протеаз.

Jacek MIKOSIŃSKI^{1#}, Konstantinos KALOGEROPOULOS^{2#}, Louise BUNDGAARD^{2,3}, Cathrine Agnete LARSEN², Simonas SAVICKAS², Aleksander Moldt HAACK², Konrad PAŃCZAK⁴, Katarzyna RYBOŁOWICZ⁵, Tomasz GRZELA^{6,7}, Michał OLSZEWSKI⁸, Piotr CISZEWSKI⁹, Karina SITEK-ZIÓŁKOWSKA¹⁰, Krystyna TWARDOWSKA-SAUCHA¹¹, Marek KARCZEWSKI^{12,13}, Daniel RABCZENKO¹⁴, Agnieszka SEGIET¹⁴, Patrycja BUCZAK-KULA¹⁵, Erwin M. SCHOOF², Sabine A. EMING¹⁶, Hans SMOLA^{16,17§} and Ulrich AUF DEM KELLER²

1. «МИКОМЕД» (MIKOMED), клиника периферических сосудистых заболеваний, Лодзь, Польша
 2. Факультет биоинженерии Технического университета Дании, кафедра изучения белков и биотерапевтических средств, Технический университет Дании, Конгенс-Люнбю, Дания
 3. Кафедра клинической ветеринарии, факультет здравоохранения и медицинских наук, Копенгагенский университет, Таструп, Дания
 4. ECRAN – ЦЕНТР ЛЕЧЕНИЯ РАН, Вроцлав, Польша
 5. Профессиональный лечебно-исследовательский центр, Оструда
 6. Клиника флебологии
 7. Варшавский медицинский университет, Варшава
 8. Центр клинических исследований при больнице г. Остроленка «Прация» (Pratia)
 9. Специализированный медицинский закрытый центр охраны здоровья «УИЛМЕД» (WILMED), Варшава
 10. Медицинский центр «СИЛМЕДИК Медикал Центр Сп. з о.о.» (SILMEDIC Medical Centre Sp. z o.o.), Катовице
 11. Специализированный медицинский центр «Медсервис» ("Medservice"), Забже
 12. Медицинский центр «КСОЛЮМЕД» (CSOLUMED)
 13. Кафедра общей и трансплантационной хирургии Польши, Познаньский университет медицинских наук, Познань
 14. Компания «Институт образования ай.и. сп. з о.о.» (Instytut Edukacji i.e. sp.z o.o.)
 15. «КлинМед Фарма» (ClinMed Pharma), Варшава, Польша
 16. Кафедра дерматологии, Кельнский университет, Кельн
 17. «ПАУЛЬ ХАРТМАНН АГ» (PAUL HARTMANN AG), Хайденхайм, Германия
- #Коллективное первое авторство.
§Коллективное последнее авторство.

Венозные трофические язвы нижних конечностей являются серьезной клинической проблемой и фактором снижения качества жизни пациентов. В настоящем исследовании рассмотрены проблемы заживления ран при венозных трофических язвах нижних конечностей на молекулярном уровне. Определяли профили экспрессии белков на предмет оценки содержания биомаркеров в отделяемом трофических язв нижних конечностей у 57 пациентов, получавших лечение с использованием полиакрилатных раневых повязок, модулирующих активность протеаз, и сравнивали с профилями экспрессии белков в раневой жидкости 10 острых ран донорского участка расщепленного кожного лоскута. При лечении венозных трофических язв нижних конечностей наблюдались следующие улучшения: 61,4% из 57 пациентов с трофическими язвами нижних конечностей достигли относительного уменьшения площади раны на $\geq 40\%$, а 50,9% из общего числа 57 пациентов достигли относительного уменьшения площади раны на $\geq 60\%$. В течение первых 14 дней, количество S100A8, S100A9, эластазы нейтрофилов, матричной металлопротеиназы-2 и фибронектина в раневой жидкости трофических язв нижних конечностей значительно снижались и оставалось стабильным, но было все же выше, чем в отделяемом острых ран. Уровни интерлейкина-1 β , фактора некроза опухоли альфа и матричной металлопротеиназы-9 были схожими в отделяемом венозных трофических язв нижних конечностей и острых ран. Количество коллагена (I) $\alpha 1$ было выше в раневых жидкостях трофических язв нижних конечностей, и значимой регуляции не наблюдалось. В целом, значимые изменения уровней биомаркеров наблюдались в течение первых 14 дней до достижения клинически стабильного заживления в когорте пациентов с венозными трофическими язвами нижних конечностей.

Ключевые слова: повязки; биомаркер; протеомика; венозная язва; раневая жидкость.

Принято 17 октября 2022 г.; предварительная электронная публикация 17 октября 2022 г.

Акта Дерматовенерология (Acta Derm Venereol) 2022 г.; 102: adv00834.

DOI: 10.2340/actadv.v102.325

Автор, ответственный за корр.: Ханс Смола (Hans Smola), «Пауль Хартманн АГ», Пауль Харманн Штр. 12, DE-89522, Хайденхайм, Германия (Paul Hartmann AG, Paul Hartmann Str. 12, DE-89522 Heidenheim, Germany); и Ульрих ауф дем Келлер (Ulrich auf dem Keller), д-р философии (PhD), Факультет биоинженерии Технического университета Дании, кафедра изучения белков и биотерапевтических средств, Технический университет Дании, площадь Сёльтофта, DK-2800 Конгенс-Люнбю, Дания (DTU Bioengineering, Section for Protein Science and Biotherapeutics, Technical University of Denmark, Søltøfts Plads, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark).

Эл. почта: hans.smola@hartmann.info; uadk@dtu.dk

Венозные трофические язвы нижних конечностей (ВТЯ) — это один из самых распространенных типов хронических ран, изученный в многочисленных клинических исследованиях (1). Эффективное лечение ВТЯ основано на устранении венозной недостаточности методом компрессионной терапии (2). Плохое заживление ран связывают с несколькими клиническими параметрами. Наличие язв в течение более 6 или 12 месяцев, большая площадь поверхности ран, превышающая 12 см², и снижение мобильности пациента — это установленные прогностические клинические маркеры (3, 4). Несмотря

АКТУАЛЬНОСТЬ

У все большего числа пациентов наблюдаются кожные раны, которые не заживают. Такие раны называются хроническими, они очень болезненны и значительно влияют на повседневную жизнь пациентов. Раневая жидкость незаживающих ран является одним из факторов, учитываемых при описании состояния раны и влияющих на прогноз возможного заживления раны. В данном исследовании был проведен анализ отделяемого венозных трофических язв нижних конечностей и сравнение относительного количества ряда белков, связанных с переходом ран из хронической фазы в острую фазу с нормальным процессом заживления. С помощью данного анализа выполнена оценка заживления при лечении ран с использованием полиакрилатных повязок.

на надлежащую медицинскую помощь, 40–50 % ВТЯ не заживают спустя 12 месяцев (5), а частота рецидивов в течение 3 месяцев после заживления остается высокой.

С точки зрения молекулярной патологии ВТЯ избыточная активность протеаз способствует распаду вновь образовавшегося внеклеточного матрикса (6), а также дезактивации фактора роста в раневом ложе (7–9). Наряду с избыточными уровнями матричных металлопротеиназ (ММП), интерлейкина (ИЛ)-1 β и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), в хронических ранах наблюдалось повышенное содержание цитокинов (9). В раневой жидкости ВТЯ измеряли уровни S100A8/S100A9 (10), а также фибронектина и коллагена (10, 11). Кроме того, протеомные методы и мультиплексный иммуноферментный анализ (ИФА) показали некоторые дополнительные различия между ВТЯ с нормальным заживлением и плохо заживающими язвами (12, 13). Был проведен анализ полученных результатов относительно потенциальной скорости заживления трофических язв до введения диеты. В некоторых из этих исследований участвовали пациенты с различными патологиями ран, и число пациентов с каждым типом раны было довольно низким.

Имеется ограниченное количество данных, описывающих более многочисленную популяцию пациентов с более однородными типами ран с четко выраженными клиническими признаками, наблюдение за которыми осуществлялось бы в течение более длительного периода времени. В данном исследовании проводили анализ ряда биомаркеров в когорте пациентов с ВТЯ и определяли, возвращались ли эти биомаркеры к уровням, соответствующим нормальному заживлению острых ран, и если возвращались, то при каких условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

Клиническая фаза данного исследования представляла собой не сравнительное открытое проспективное когортное исследование в 2 группах для оценки заживления ВТЯ (когорты ВТЯ) и ран донорского участка расщепленного кожного лоскута (когорты острых ран). В обеих когортах лечение ран включало использование полиакрилатсодержащей раневой повязки, предварительно активированной раствором Рингера (HydroClean®, «Пауль Хартманн АГ» (Paul Hartmann AG), Хайденхайм, Германия), а все пациенты в когорте ВТЯ получали дополнительную компрессионную терапию (PütterPro 2®, «Пауль Хартманн АГ»), которая является важным компонентом комплексного лечения венозных трофических язв нижних конечностей (2). Исследование представляло собой многоцентровое проспективное наблюдательное исследование, в котором

осуществляли сбор клинических данных пациентов в когортах заживления ВТЯ и острых ран, получавших лечение с использованием раневых повязок HydroClean® в период с ноября 2018 года по ноябрь 2019 года в 9 специализированных учреждениях в Польше. После получения информированного согласия, пациентов включали в исследование; за пациентами в когорте ВТЯ (группа А) наблюдали в течение 12 недель или до полного закрытия раны. Раны донорских участков после забора расщеплённых кожных трансплантатов (группа В) наблюдались в течение 21 дня у пациентов, которым проводилась пересадка кожи для хирургического закрытия других ран, не входивших в рамки данного исследования. Глубину установки устройства для забора лоскута определял врач. Размер раны фиксировали методом планиметрии (обвод контуров с использованием ацетатной пленки) один раз в 2 недели в когорте ВТЯ и в Дни 0, 2, 4, 7, 10, 14, 17 и 21 в когорте острых ран.

Клинические исходы

Клинические конечные точки включали уменьшение площади раны (абсолютный размер раны (см²)) и относительное уменьшение площади раны (УПР, выраженное в процентах; (размер раны t_0 – размер раны t_{last}) / размер раны $t_0 \times 100$), количество ран с УПР > 40 % и > 60 %, количество заживших ран, уровень экссудации по оценке врача, состояние кожи окolorаневой области, изменение интенсивности боли в области раны, интенсивность боли при смене повязки и нежелательные явления, связанные с использованием повязки. Оценку динамики образования грануляционной ткани (выраженной в процентах от общей площади поверхности раны) выполняли 2 независимых исследователя. В случаях, когда результаты оценки различались более чем на 20 %, решение принималось путем совместного обсуждения фотографий этих ран. Раневую жидкость экстрагировали из использованных повязок.

Отбор образцов и экстрагирование раневой жидкости из повязок

У всех пациентов отбор образцов раневой жидкости на этапе включения выполняли наложением стерильной нетканой салфетки (Medicomp® sterile, содержание целлюлозного волокна 70 %, полиэфирного волокна 30 %; «Пауль Хартманн АГ») за 2 часа до санации или очищения раны с последующим наложением повязки HydroClean®. Пропитанную раневую жидкостью салфетку Medicomp® помещали в пластиковый пакет, замораживали и хранили при температуре -20 °C до начала экстрагирования. Во всех иных временных точках полиакрилатные повязки (HydroClean®) снимали во время визитов, помещали в пластиковые пакеты, замораживали и хранили при температуре -20 °C до начала биохимической экстракции.

Пропитанные раневой жидкостью салфетки Medicomp® (вся повязка) и Hydroclean® (внутренний полиакрилатный слой) инкубировали в буферном растворе со смесью ингибиторов протеаз cOmplete™ Mini, не содержащей ЭДТА (50 mM HEPES с pH 7,8, 150 mM NaCl, 10 mM ЭДТА) («Мерк» (Merck), Дармштадт, Германия) для получения экстракта белков. Остатки полимеров удаляли путем фильтрации жидкой фазы через клеточное сито с размером пор 40 мкм (Fisherbrand™ Sterile Cell Strainers, кат. номер 22-363-547, «Термо Фишер Сайентифик» (Thermo Fisher Scientific), Уолтэм, Массачусетс, США), а клеточный дебрис удаляли центрифугированием (3 × 15 мин, 4000 g, 4 °C) с последующим концентрированием образцов (фильтр для центрифугирования Amicon® Ultra-15, 3 кДа, UFC9003, «Миллипор» (Millipore), «Мерк»). Концентрацию белков

определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop One™ («Термо Фишер Сайентифик»).

Анализ раневой жидкости методом панорамной протеомики

В общей сложности 20 мкг экстрагированных белков денатурировали в смеси 2,5 М гуанидина гидрохлорида (GuHCl), 100 mM буферного раствора HEPES с pH 7,8, цистеина, восстановленного с использованием трис(2-карбоксиэтил) фосфина (TCEP) и алкилированного хлорацетамидом, с последующим триптическим гидролизом (соотношение протеаза: белок 1:50 (м/м)) в течение ночи после доведения концентрации GuHCl до 0,5 М. Образцы обессоливали с использованием оригинального оборудования для очистки белков Stage-Tips. Для анализа методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ/МС) использовали жидкостный хроматограф EASY-nLC 1200 оснащенный масс-спектрометром Q Exactive™ («Термо Фишер Сайентифик») в положительной полярности в режиме, зависящем от данных (DDA), с активным градиентом в течение 140 мин. (сначала 6 % от 80 % ацетонитрила в воде, увеличение до 23 % через 85 мин., до 38 % через 115 мин., до 60 % через 125 мин., до 95 % через 130 мин. с выдерживанием до завершения градиентного элюирования). Вводили объем пробы, соответствующий содержанию 500 нг пептидов в образце, которое определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop One™. Разрешение MS1 устанавливали на уровне 70 000, автоматический контроль усиления (AGC) – 3e6, максимальное время ввода пробы 20 мс, диапазон сканирования 300-1750 m/z с выбором 10 ионов MS1 для анализа MS2. При сканировании MS2 использовали разрешение 17500, AGC – 1e6, максимальное время ввода пробы 60 мс и окно селекции 1,6 m/z при нормализованной энергии столкновения 25. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения SpectroMine™ версии 3.0 («Биогнозис» (Biognosys), Шлирен, Швейцария). Необработанные МС-спектры исследовали путем сравнения с рецензированной базой данных Homo sapiens, скачанной из базы данных белковых последовательностей UniProt Database (таксономический идентификатор 9606, 42252 запроса SwissProt, 25 ноября 2017 г.). Исследования проводили с погрешностью 10 ppm и 0,01 Да в отношении ионов-предшественников и фрагментных ионов соответственно. Трипсин/Р устанавливали как тип используемой протеазы, а карбамидометилирование цистеиновых остатков (+57,021 Да) добавляли как статическую модификацию, при этом окисление (+15,995 Да) и N-терминальное ацетилирование белков (+42,01 Да) добавляли как переменные модификации. Диапазон длин кандидатных пептидов составлял 7-52 аминокислотных остатка. Коэффициенты соответствия масс-спектров пептидов (PSM) устанавливали как уровень ложных отклонений (FDR) не более 1 %. Затем масс-спектры фильтровали на соответствие PSM установленному значению FDR 1 % на уровне пептидов и белков. Количественную оценку выполняли с помощью безмаркерного алгоритма количественного определения (LFQ) SpectroMine™.

Анализ биохимических маркеров с использованием метода SureQuant™.

Уровень биохимических маркеров в раневой жидкости определяли методом протеомики на основе масс-спектрометрии. Для оценки противовоспалительной активности, были выбраны ИЛ-1β, ФНО-α, S100A8 и S100A9. ИЛ-1β и ФНО-α – основные регуляторы каскада воспалительных реакций, а S100A8 и S100A9 – цитокины, экспрессируемые на высоком уровне в полиморфноядерных нейтрофилах в количестве до 45 % от цитозольного белка (14).

Для описания протеолитической среды в настоящем исследовании проводили анализ на содержание эластазы нейтрофилов, ММП-2, ММП-9, а для оценки элементов внеклеточного матрикса мы выбрали коллаген (I) $\alpha 1$ и фибронектин. Для анализа биомаркеров использовали метод протеомики на основе масс-спектрометрии, который не зависит от антител, и который продемонстрировал преимущества по сравнению с иммунохимическими исследованиями, такими как вестерн-блот и ИФА, в том, что касается специфичности идентификации белков и точности количественного определения. В частности, для целевой протеомики на основе мониторинга параллельных реакций использовали новый метод SureQuant™ (15), оптимизированный для данного проекта. Вкратце, обнаружение тяжелых пептидов, меченых изотопом и соответствующих внутреннему стандарту, инициирует получение MS-изображений исследуемых эндогенных пептидов, обеспечивая более высокую чувствительность и точность, чем применявшиеся ранее методы целевой протеомики. Подробная информация об оптимизированном рабочем процессе будет опубликована отдельно.

В общей сложности 100 мкг экстрагированных белков денатурировали в смеси 2,5 М гуанидина гидрохлорида (GuHCl), 100 мМ буферного раствора HEPES с pH 7,8, цистеина, восстановленного с использованием TCEP и алкилированного хлорацетамидом, с последующим триптическим гидролизом (соотношение протеаза:белок 1:50 (м/м)) в течение ночи после доведения концентрации GuHCl до 0,5 М. Образцы (1000 нг пептидов и 0,8 пмоль тяжелых пептидов) загружали в колонки Evo-tip («Эвосеп» (Evosep), Оденсе, Дания) и выполняли разделение на системе Evosep («Эвосеп»). Использовали одну хроматографическую систему, оснащенную масс-спектрометром Exploris 480 («Термо Фишер Сайентифик»). Разделения достигали из неподвижной фазы за 11,5 мин. в соответствии со стандартным методом производителя «100 образцов в сутки» (100SPD), а для регистрации спектров использовали режим анализа SureQuant™, содержащий перечень включения пептидов-предшественников и их переходов. Обработку и фильтрацию пиков выполняли в программной среде Skyline, версия 20.1 (16). Для дальнейшего анализа был экспортирован обработанный отчет, содержащий значения площади под кривой (AUC) для переходов выбранных предшественников. Совокупная площадь хроматограмм ионного тока для всех MS-прогонов была получена на основе исходных данных и использована для нормализации значений AUC для переходов. Значения белков рассчитывали по сумме значений переходов пептидов, при этом для каждого белка рассчитывали ожидаемые массы 2 пептидов. Для сравнения и визуализации полученные значения белков масштабировали для каждого белка отдельно по шкале от 0 до 100.

Статистический анализ

Поскольку это исследование было поисковым, и лонгитюдные данные о белках раневой жидкости острых ран и ВТЯ для схожих популяций исследования отсутствовали, расчет размера выборки не проводили. Для анализа клинических данных использовали методы описательной статистики. Описание непрерывных переменных включало количество наблюдений (N), среднее значение, стандартное отклонение, медиану, первый и третий квартили, минимальное и максимальное значение. Категориальные и порядковые переменные описывали по их частоте и процентному содержанию, при этом процентное содержание рассчитывали на основе фактических значений. Метод

переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF) использовали для подстановки отсутствующих данных в анализе клинических параметров ран (абсолютная площадь раны, УПР, УПР > 40 %, УПР > 60 %, грануляционная ткань на раневой поверхности, максимальная боль от раны в течение последних 24 часов (ВАШ), боль при смене повязок (ВАШ)). Анализ всех исходов проводили для всех пациентов, соответствовавших критериям включения и исключения в исследование, которые получали лечение ран с использованием полиакрилатных раневых повязок хотя бы однократно, и у которых был измерен показатель площади раны во время визита включения и затем хотя бы еще 1 дополнительное значение площади раны. Регистрировали только результаты оценки в популяции всех рандомизированных пациентов согласно назначенному лечению (ITT-популяции), если не указано иное. Для расчета р-значений для значимых различий между значениями биохимических маркеров, попарное сравнение всех контрольных точек выполняли с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона для зависимых данных и U-критерия Манна-Уитни для независимых данных, оба с поправками для множественных сравнений (метод Бенджамини-Хохберга для контроля частоты ложных обнаружений, уровень значимости альфа 0,05). В разделе результатов указаны только значимые р-значения.

Таблица I. Характеристики пациентов

	Пациенты с трофическими венозными язвами нижних конечностей (группа А)	Пациенты с ранами донорского участка расщепленного кожного лоскута (группа В)
Возраст (лет), среднее значение (SD)	69,2 (11,9)	69,5 (11,7)
Медиана (мин. – макс. знач.)	71,0 (34–90)	70,0 (44–85)
Пол, n (%)		
Мужской	26 (45,6)	4 (40,0)
Женский	31 (54,4)	6 (60,0)
Рост (см), среднее значение (SD)	167,3 (12,0)	165,3 (10,5)
Медиана (мин. – макс. знач.)	166,0 (146–203)	166,5 (150–182)
Масса тела (кг), среднее значение (SD)	85,5 (22,9)	90,1 (20,1)
Медиана (мин. – макс. знач.)	82,0 (46,0–146,0)	94,5 (61,0–115,0)
Индекс массы тела (кг/м ²), среднее значение (SD)	30,3 (6,4)	32,8 (6,2)
Медиана (мин. – макс. знач.)	29,4 (20,0–52,1)	30,9 (25,1–43,8)
Хроническая венозная недостаточность, n (%)	55 (96,5)	
ЛПИ, среднее значение (SD)	0,957 (0,075)	
Медиана (мин. – макс. знач.)	1,000 (0,81–1,05)	
Пальпируемый пульс нижних конечностей, n (%)		
A. pedalis dorsalis	56 (98,2)	
A. tibialis posterior	56 (98,2)	
Тромбоз глубоких вен в анамнезе, n (%)	9 (15,8)	
Операции на венах в анамнезе, n (%)	18 (31,6)	
Сахарный диабет, n (%)	7 (12,3)	1 (10,0)
HbA1c (%), среднее значение (SD)	6,37 (0,88)	7,30 (н/п)
Медиана (мин. – макс. знач.)	6,30 (5,2–7,8)	7,30 (7,30, 7,30)
Застойная недостаточность кровообращения, n (%)	1 (1,8)	
Пациент курит в настоящее время, n (%)	8 (14,0)	0 (0,0)
SD — стандартное отклонение; ЛПИ — лодыжечно-плечевой индекс (давления); н/п — не применимо		

Этические факторы

Данное исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией (17), а также законами и нормативными положениями Польши. Данное исследование было одобрено Комитетом по биоэтике

Силезской Врачебной палаты, Катовице, Польша (номер решения 35/2018) и зарегистрировано в Реестре клинических исследований Германии (DRKS00015832).

Доступность данных

Все результаты анализа методом протеомики на основе масс-спектрометрии, указанные в настоящем исследовании, размещены на платформе PanoramaWeb (<https://panorama-maweb.org/RPD8Te.url>) (эл. почта: panorama+reviewer24@proteinms.net; пароль: lJLRyQct), идентификатор набора данных PXD025748 (<http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PX025748>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические исходы в когорте венозных трофических язв нижних конечностей

В общей сложности 74 пациента прошли скрининг в когорте ВТЯ, и 57 соответствующих критериям включения пациентов были включены в данное проспективное, многоцентровое, наблюдательное исследование и получали лечение в течение 12 недель или до полного закрытия раны. Из 57 пациентов, включенных в исследование (средний период наблюдения $76,9 \pm 18,7$ дня), 47 завершили исследование в соответствии с протоколом (средний период наблюдения $84,5 \pm 1,9$ дня). Десять пациентов преждевременно завершили участие в исследовании в связи с полным закрытием раны до завершающего визита (6 пациентов), отзывом согласия (3 пациента) и по неуказанной причине (1 пациент). Для сравнения биохимических маркеров в экссудате ВТЯ, во вторую когорту были включены 10 пациентов с ранами донорских участков после забора расщепленных кожных трансплантатов, прошедших скрининг и соответствовавших критериям включения в исследование. Пациентов наблюдали в течение 21 дня. Из 10 пациентов, включенных в исследование (средний период наблюдения $19,8 \pm 3,3$ дня), 8 завершили исследование в соответствии с протоколом (средний период наблюдения $21,2 \pm 0,9$ дня). Два пациента преждевременно завершили участие в исследовании в связи с полным закрытием раны до завершающего визита. В **Таблице I** представлена информация о характеристиках пациентов и медицинском анамнезе, а в **Таблице II** — описание характеристик ран пациентов на этапе включения в исследование. Для всех пациентов в когорте с венозными трофическими язвами нижних конечностей проводилась компрессионная терапия.

Таблица II. Характеристики раны

	Венозные трофические язвы нижних конечностей (группа А)	Раны донорского участка расщепленного кожного лоскута (группа В)
Размер раны, см ² , среднее значение (SD)	18,7 (12,3)	40,3 (30,9)
Медиана (мин.–макс. знач.)	14,0 (5,8–59,1)	33,5 (11,4–121,2)
Раны > 10 см ² , n (%)	43 (75,4)	10
Возраст раны (месяцев), среднее значение (SD)	11,5 (8,4)	
Медиана (мин.–макс. знач.)	8,0 (3–36)	
Возраст раны ≥ 6 месяцев, n (%)	32 (56,1)	
Относительная площадь раны, покрытой		
Некротической тканью, %, среднее значение (SD)	0,3 (1,5)	
Фибриновыми отложениями, %, среднее значение (SD)	60,9 (30,7)	
Грануляционной тканью, %, среднее значение (SD)	38,8 (30,8)	
SD — стандартное отклонение		

Абсолютное уменьшение размера раны в когорте ВТЯ показано на Рис. 1А. Относительное УПР достигало $38,5 \pm 49,1$ % на 8-й неделе и $48,9 \pm 51,9$ % на 12-й неделе (Рис. 1В). Полное закрытие раны было зарегистрировано у 5 (8,8 %) пациентов на 8-й неделе и у 10 (17,5 %) пациентов на 12-й неделе. На 8-й неделе количество пациентов, у которых отмечалось относительное УПР ≥ 40 %, составило 32 (56,1 %) человека, а ≥ 60 % — 22 (38,6 %) человека; на 12-й неделе УПР ≥ 40 % отмечалось у 35 (61,4 %) пациентов, а ≥ 60 % — у 29 (50,9 %) пациентов (Рис. 1С). Через 4 недели УПР > 30 % (прогностический фактор заживления на 24-й неделе) не было достигнуто у 35 из 57 пациентов (17). В данном исследовании сбор данных о рецидивах после 12-недельного периода наблюдения не проводили.

Образование грануляционной ткани достигало максимума на 6-й неделе, а стойкая эпителизация отмечалась на 10-й неделе. Было зарегистрировано два нежелательных явления.

Из 10 ран донорского участка расщепленного кожного лоскута, 2 раны полностью зажили в течение 21 дня. Абсолютное уменьшение площади раны и относительная динамика УПР представлены на Рис. 1. Примерно на 4-й день наблюдалось образование грануляционной ткани и начало эпителизации. Расчетные уровни экссудации достигали максимума на 7-й день, а затем равномерно снижались.

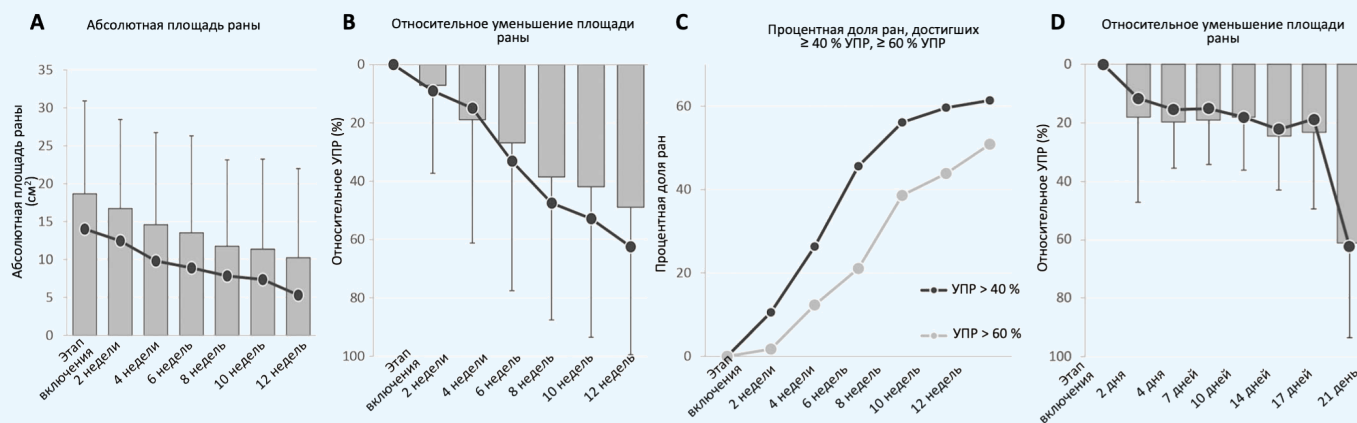


Рис. 1. Динамика площади ран в когорте венозных трофических язв нижних конечностей. (А) Динамика абсолютной площади ран (см²). (В) Относительное уменьшение площади ран (УПР) (%). (С) Процентная доля ран, достигших относительного УПР ≥ 40 % (темные точки) и ≥ 60 % (серые точки). (D) Относительное уменьшение площади ран (УПР) (%) в когорте ран донорского участка расщепленного кожного лоскута. (А–D) Средние значения показаны в серых столбцах с соответствующими значениями медианы в виде темных точек.

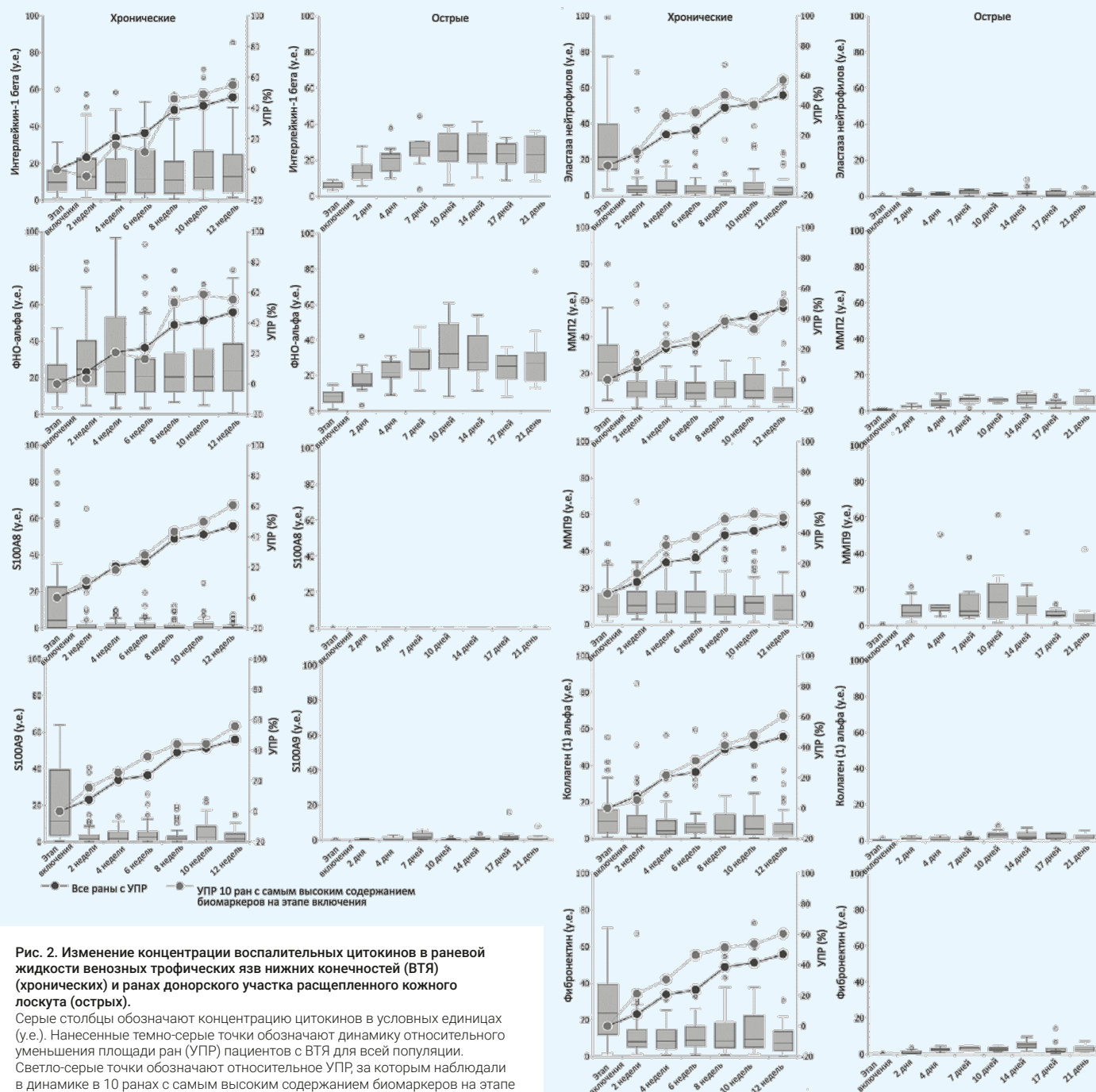


Рис. 2. Изменение концентрации воспалительных цитокинов в раневой жидкости венозных трофических язв нижних конечностей (ВТЯ) (хронических) и ранах донорского участка расщепленного кожного лоскута (острых).
Серые столбцы обозначают концентрацию цитокинов в условных единицах (у.е.). Нанесенные темно-серые точки обозначают динамику относительного уменьшения площади ран (УПР) пациентов с ВТЯ для всей популяции. Светло-серые точки обозначают относительное УПР, за которым наблюдали в динамике в 10 ранах с самым высоким содержанием биомаркеров на этапе включения в исследование.

Анализ биомаркеров в образцах раневой жидкости

Раневую жидкость экстрагировали из использованных повязок и проводили анализ на предмет относительного содержания белков, входящих в перечень изученных биомаркеров, характерных для процесса заживления ран (ИЛ-1α, ФНО-β, S100A8, S100A9, эластаза нейтрофилов, ММП-2 и ММП-9, коллаген (I) α1, фибронектин). Удалось собрать и проанализировать полные наборы данных высокого качества для 43 из 57 ран в когорте ВТЯ и всех острых ран. В когорте ВТЯ для анализа был доступен 301 образец раневой жидкости. В группе ран донорского участка расщепленного кожного лоскута было проанализировано 8 из 10 ран и в общей сложности 64 образца раневой жидкости. Всего 337 образцов раневой жидкости (полные наборы данных для 39 пациентов с ВТЯ и 8 пациентов с ранами донорского участка расщепленного кожного лоскута) было включено в окончательные результаты после обработки.

Для подтверждения того, что повязки обоих типов (MediComp® и HydroClean®) надежным образом абсорбируют и высвобождают белки раневой жидкости независимо от способа связывания, мы сначала определяли общий протеом, экстрагированный из повязок обоих типов у одного и того же пациента методом панорамной протеомики. Таким образом, мы идентифицировали 1150 уникальных белков из повязок MediComp® и 835 белков из повязок HydroClean® соответственно, включая все выбранные раневые маркеры, кроме ФНО-α с самым низким уровнем. Оба протеома демонстрировали высокую схожесть с уровнем тождественности > 80 % для 100 белков с самым высоким содержанием, при этом глобальные изменения относительного уровня содержания отсутствовали по результатам количественного определения безмаркерным методом.

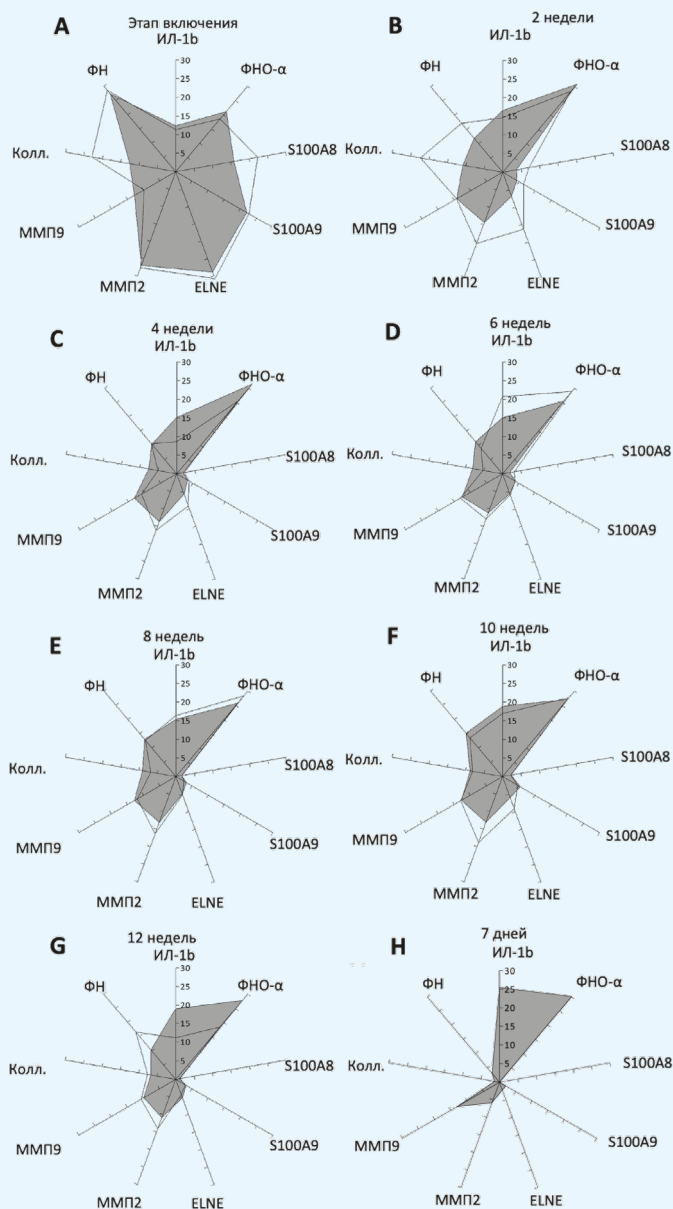


Рис. 3. Профили биомаркеров в образцах раневой жидкости венозных трофических язв нижних конечностей.

Серые участки обозначают средние значения по всей популяции; темные линии обозначают средние значения биомаркера у 10 пациентов с наихудшими показателями или относительным уменьшением площади ран (УПР) в соответствующих временных точках. (А) На этапе включения, (В) 2 недели, (С) 4 недели, (D) 6 недель, (Е) 8 недель, (F) 10 недель и (G) 12 недель. Что касается 10 пациентов с наихудшими показателями, расчет динамики относительного УПР был невозможен; для оценки ответов биомаркеров на этапе включения использовали относительные значения УПР в контрольной точке Неделя 2. (H) Профили экспрессии в когорте острых ран через 7 дней. ИЛ-1 β : интерлейкин 1 β ; ФНО- α : фактор некроза опухоли-альфа, ELNE: эластаза нейтрофилов; MMP2: матричная металлопротеиназа-2; MMP9: матричная металлопротеиназа-9; Колл. (I) α 1: коллаген (I) α 1; ФН: фибронектин.

Это означало, что наблюдаемые различия в количестве белков, действительно, связаны с отдельными временными точками ран, а не с типом повязки.

Наибольшие различия между пациентами в отношении количества воспалительных медиаторов наблюдали в когорте ВТЯ. Что касается ИЛ-1 β , медиана его содержания оставалась в узком диапазоне от 9,6 до 12,9 условных единиц (у.е.) в течение всего исследования (Рис. 2). Наблюдали значимое увеличение содержания ФНО- α

относительно уровня этапа включения, с 19,1 у.е. до 24,7 у.е. через 2 недели ($p = 0,007$), затем данный показатель оставался в этом диапазоне в течение всего исследования (Рис. 2). S100A8 и S100A9 демонстрировали наиболее выраженные различия с точки зрения регуляции. Медиана содержания S100A8 значимо снижалась с 4,3 у.е. на этапе включения до 0,4 через 2 недели ($p = 0,002$), и далее оставалась в диапазоне от 0,3 до 0,6 у.е. (Рис. 2). Медиана содержания S100A9 снижалась с 11,2 у.е. на этапе включения до 1,6 через 2 недели ($p < 0,001$), не превышая 2,4 в течение остального периода исследования (Рис. 2). В подгруппе ран с 10 самыми высокими значениями на этапе включения наблюдали траектории заживления, сопоставимые с общей популяцией (Рис. 2). Относительно протеаз, мы также отмечаем резкое снижение уровня эластазы нейтрофилов и MMP-2 в течение первых 2 недель. Медиана уровня эластазы нейтрофилов на этапе включения составила 21,3 у.е., а затем снизилась до 3,0 у.е. ($p < 0,001$) (Рис. 2). Медиана уровня MMP-2 снизилась с 26,2 у.е. на этапе включения до 10,3 у.е. через 2 недели ($p < 0,001$) (Рис. 2). Уровень MMP-9, напротив, оставался почти неизменным на протяжении всего исследования (Рис. 2). Медиана уровня коллагена (I) α 1 находилась в диапазоне от 9,5 у.е. до 3,7 у.е. через 12 недель (Рис. 2). Наконец, медиана уровня фибронектина составила 23,9 у.е. на этапе включения и снизилась до 8,2 у.е. через 2 недели ($p = 0,002$) (Рис. 2). Опять же, при сравнении средних значений относительного уменьшения площади ран во всей популяции и в подгруппе с 10 самыми высокими значениями содержания биомаркеров на этапе включения, значимые различия отсутствовали (Рис. 2). За период наблюдения характер распределения относительного содержания биомаркеров в ранах пациентов с ВТЯ изменился в сторону распределения, напоминающего профиль биомаркеров при остром заживлении ран (Рис. 3). Выраженные изменения отмечались в период между этапом включения и 2-й неделей. Сопоставимость профилей стала проявляться лишь на 4-й неделе. При сравнении средних значений 10 ран с наихудшим результатом заживления по показателю УПР и в каждой временной точке со средними значениями для всей когорты, было отмечено, что показатели начали проявлять сопоставимость на 4-й неделе. До этой контрольной точки раны с плохим заживлением демонстрировали высокие уровни эластазы нейтрофилов, MMP-2, коллагена (I) α 1 и фибронектина (Рис. 3). Тем не менее, эти различия не достигли статистической значимости (согласно U-критерию Манна-Уитни), поскольку количество пациентов было слишком малым. Кроме того, размер этой когорты был слишком мал для подробного статистического анализа в подгруппах пациентов, например, пациентов с сахарным диабетом или местными раневыми инфекциями.

В когорте заживления острых ран было собрано 64 образца раневой жидкости. Медиана уровней ИЛ-1 β и ФНО- α постепенно увеличивалась до 7-го дня, затем незначительно снижалась до 21-го дня (Рис. 2). Уровень S100A8 находился в области предела обнаружения (Рис. 2), а уровень S100A9 был крайне низким (Рис. 2). Уровень эластазы нейтрофилов и MMP-2 был низким, достигал максимума через 7 дней и снижался в течение остального периода наблюдения (Рис. 2). Медиана уровня MMP-9 повышалась до 10-го дня, затем снижалась (Рис. 2). Коллаген (I) α 1 и фибронектин подлежали обнаружению, но их уровень оставался низким (Рис. 2). Профиль распределения биомаркеров в раневой жидкости на 7-й день, соответствующий самому высокому уровню экспрессии, представлен на Рис. 3Н.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании проводили сравнительный анализ лонгитюдных данных содержания биохимических маркеров в раневых жидкостях в когорте пациентов с ВТЯ, а также в когорте заживления острых ран с диапазонами этих маркеров, репрезентативных для нормального процесса заживления. Характеристики пациентов в когорте ВТЯ были типичными и сопоставимыми с другими опубликованными исследованиями для оценки венозных трофических язв нижних конечностей (3, 18, 19). В данном исследовании оценивали высокую процентную долю ран с плохими характеристиками заживления (размер более 10 см² и возраст более 6 месяцев) и показателем УПР менее 30 % на 4-й неделе, что указывало на медленное заживление в течение 24 недель (2, 3, 19-21). Кроме того, на этапе включения преобладали фибриновые отложения, что указывало на продолжающийся процесс формирования грануляционной ткани. Результаты заживления ВТЯ в текущем исследовании, вероятно, схожи с результатами, опубликованными в литературе и отчетах рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) с качественным дизайном (22). Скорость заживления ран донорского участка расщепленного кожного лоскута в текущем исследовании была немного ниже, чем в крупном РКИ по оценке заживления ран донорского участка расщепленного кожного лоскута (23). Это могло быть обусловлено методом забора лоскута с получением лоскутов большей толщины, показателями, специфичными для пациента, или факторами, связанными с повязками, например, связывание двухвалентных ионов и/или ММП. Тем не менее, в данной группе наблюдали прогнозируемую регуляцию биохимических маркеров в раневых жидкостях, подтверждая результаты ранее проведенных экспериментов по заживлению эксцизионных ран у свиней (24).

В ходе анализа экспрессии биомаркеров в отделяемом хронических ран в текущем исследовании были выявлены значимые различия в течение первых 2 недель, после чего характер распределения оставался относительно постоянным. При сравнении профиля экспрессии биомаркеров с профилем, наблюдаемым при заживлении острых ран, уровень ИЛ-1 β и ФНО- α характеризовался сопоставимыми диапазонами концентраций. Тем не менее, для S100A8 и S100A9 на этапе включения наблюдали значимые различия при сравнении острых и хронических ран. Схожую картину наблюдали в отношении эластазы нейтрофилов и ММП-2, когда высокая концентрация в отделяемом хронических ран на этапе включения значимо снижалась в течение 14 дней, но не достигала низкого уровня, наблюдаемого в отделяемом острых ран. С другой стороны, выраженная регуляция ММП-9 в жидкости хронических ран не наблюдалась, и диапазон был схожим с диапазоном, наблюдаемым в острых ранах через 7 и 10 дней. Следует отметить, что схожий уровень ММП-9 в хронических и острых ранах был зарегистрирован ранее Киркетерп-Мёллером (Kirketerp-Møller) и соавт. (25). Уровень коллагена (I) α 1 и фибронектина был повышен в образцах жидкости хронических ран по сравнению с образцами жидкости острых ран, но только фибронектин демонстрировал снижение уровня в отделяемом хронических ран, начиная с уровня на этапе включения и до 2-й недели. Следует отметить, что при использовании данного метода невозможно различить протеолитически активированные, расщепленные и неактивные проформы, следовательно, в данном исследовании не может проводиться оценка биологической активности исследуемых соединений. В целом, текущие данные демонстрируют комплексную картину регуляции биомаркеров в раневой среде острых и хронических ран, а также в ходе лечения хронических ран.

Следует отметить, что сам по себе данный набор биомаркеров не предназначен для описания каскада заживления ран, а скорее служит для описания состояния ран на молекулярном уровне. Данные биомаркеры были выбраны как ключевые факторы заживления ран, что было подробно описано ранее.

Было показано, что в острых ранах наблюдается экспрессия S100A8 и S100A9 (26). Нейтрофильные гранулоциты содержат большое количество предварительно сформированных S100A8/S100A9, которые могут немедленно высвободиться и далее стимулировать миграцию нейтрофилов в ткани раневого ложа (27), а также активировать толл-подобный рецептор 4 (TLR4) (28). Наряду с высвобождением предварительно сформированных S100A8/S100A9, также показано, что нейтрофилы экспрессируют мРНК в раневом ложе (26) вместе с макрофагами и кератиноцитами на краях раневого ложа. Возможно, в текущем исследовании в отделяемом ВТЯ избыточно высокий уровень S100A8 и S100A9 на этапе включения был преимущественно обусловлен нейтрофилами. Данная гипотеза может быть подтверждена одновременно высоким уровнем эластазы нейтрофилов на этапе включения и параллельным снижением уровней S100A8 и S100A9. Что касается эластазы нейтрофилов, здесь описаны зарегистрированная в данном исследовании широкая вариация уровней содержания в отделяемом хронических ран с тенденцией к снижению по мере заживления (29). Стоит отметить, что наши результаты относительно S100A8 и S100A9 отличаются от результатов, полученных Трострупом (Trøstrup) и соавт. (10). Эти авторы показали значимо более низкий уровень обоих медиаторов в раневой жидкости хронических ран по сравнению с уровнями в жидкости острых ран. Эти расхождения не могут быть обоснованы имеющимися клиническими данными; тем не менее, различия в бактериальной бионагрузке ран могли оказать влияние на уровни S100A8 и S100A9 в хронических ранах (28). Более того, белковый комплекс S100A8/A9 идентифицирован как защитный медиатор иммунного ответа в невропатических язвах, обусловленных синдромом диабетической стопы (30). Будет очень интересно отследить это в дальнейших исследованиях, особенно корреляции с бактериальной бионагрузкой.

Уровни ММП-2 были сопоставлены с фибробластами соединительной ткани и эндотелиальными клетками в острых ранах (30, 31). В эпидермисе почти полностью отсутствовали сигналы ММП-2 при оценке методом гибридизации *in-situ*. мРНК и белок ММП-2 постоянно присутствуют в здоровой коже, что может указывать на физиологическую роль ММП-2 в соединительной ткани (32). У пациентов с ВТЯ наблюдали окрашивание на ММП-2 в раневом ложе (33), при этом окрашивание на ММП-2 было более интенсивным при оценке в незаживающих язвах (34). Более того, наблюдалось, что среди остальных матриксных металлопротеиназ только ММП-2 отвечала на компрессионную терапию (35). Более благоприятные исходы заживления наблюдались у пациентов с ВТЯ, у которых уровень ММП-1, ММП-2 и ММП-3 снижался через 4 недели лечения (35). Имеющиеся данные не позволяют делать какие-либо предположения о том, привели ли высокие уровни эластазы нейтрофилов и белка ММП-2 на этапе включения к формированию микросреды с чрезмерной активностью протеаз. Нами не установлено, были ли активированы протеазы, а также не установлено содержание ингибиторов протеаз, таких как различные ТИМП (тканевые ингибиторы металлопротеиназ). На основании опубликованной литературы, можно прогнозировать высокую суммарную протеазную активность (29).

Полученные нами данные об уровне коллагена (I) $\alpha 1$ и фибронектина с трудом поддаются интерпретации. Белок коллагена (I) $\alpha 1$ в раневых жидкостях, возможно, указывал на разложение соединительной ткани или продуцирование нового коллагена со слабой способностью к отложению и сшиванию в новые фибриллы. Более высокие уровни в отделяемом хронических ран указывают на нарушение продукции и отложения коллагена (I) в грануляционной ткани по сравнению с отделяемым острых ран примерно через 10 дней, когда наблюдается выраженное формирование грануляционной ткани. Измерение тепопептидов и пропептидов коллагена (I) в раневых жидкостях позволяет отличить процесс образования нового коллагена от выявления фрагментов расщепленного коллагена (I) $\alpha 1$ в отделяемом хронических ран. Более того, что касается фибронектина, его источник, механизм циркуляции и/или локального продуцирования в грануляционной ткани остаются неизвестными. Невозможно установить, был ли образован выявленный нами фибронектин как эктодомен А — форма фибронектина, потенциально стимулирующая рецепторы TLR4. Проведенные ранее исследования позволяют предположить локальное продуцирование фибронектина в венозных трофических язвах нижних конечностей (10). Возможно, ранние изменения клинического ответа и регуляции биомаркеров могут быть обусловлены биологическими эффектами полиакрилатных суперабсорбентов в раневых повязках, такими как ингибирование протеиназы (19).

В некоторых других исследованиях проводили анализ раневой жидкости венозных трофических язв нижних конечностей и определяли разницу между острыми и хроническими ранами, а также между заживающими и незаживающими хроническими ранами (10, 12, 13, 24, 36, 37), при этом цель некоторых исследований заключалась в получении прогностических маркеров для оценки вероятности заживления/незаживления. В рамках текущего исследования не была предусмотрена дальнейшая идентификация прогностических маркеров. Ранний клинический ответ мог представлять собой стойкий и доступный показатель вероятности заживления (3, 4).

Данное исследование позволяет сделать вывод о наличии быстрого биохимического ответа в течение 14 дней, затем картина остается неизменной со 2-й по 12-ю неделю. Клинические показатели улучшались намного позже, при этом формирование грануляционной ткани достигало максимума через 6 недель, а эпителизация — через 10 недель. Биохимическая сигнатура указывает на раннее снижение активности нейтрофилов. Биомаркерная сигнатура в отделяемом хронических ран на этапе включения в исследование имеет характеристики хронического непродуктивного воспаления. Это очевидно с клинической точки зрения. Изменения в образцах раневой жидкости ВТЯ в течение первых 2 недель могли указывать на снижение активности STAT3. Регуляция S100A8, S100A9 и ММП-2 осуществляется посредством различных путей, включая STAT3 (38-41), и по прошествии первых двух недель сохранялась и преобладала доминантная сигнатура транскрипционного фактора NF- κ , на что указывало повышение уровней ИЛ-1 β , ФНО- α и ММП-9. С помощью данной гипотезы можно обосновать полученный профиль распределения биомаркеров в раневой жидкости ВТЯ в период наблюдения. Будет интересно проверить эту гипотезу в будущих исследованиях.

Ограничения исследования

Данное проспективное исследование имеет ряд ограничений, особенно в том, что касается генерализации результатов. По большей части, размер выборки был относительно небольшим, особенно в когорте заживления острых ран. Когорта заживления острых ран была включена для оценки уровней содержания биохимических маркеров при нормальном заживлении ран, а также в качестве эталона для сравнения с уровнями биомаркеров в когорте ВТЯ. Кроме того, значения площади ран в когортах заживления ВТЯ и острых ран различались. Эпителизация ран донорского участка расщепленного кожного лоскута преимущественно обусловлена участием кожных придатков в раневой области, поэтому общее заживление происходит достаточно быстро с учетом абсолютного размера ран. И в данном исследовании характер экспрессии в когорте заживления острых ран соответствовал таковому при заживлении острых ран, как было показано в исследованиях заживления острых ран на животных (26). И, наконец, сбор раневой жидкости на этапе включения был менее продолжительным, чем в последующих временных точках, и это могло влиять на уровень некоторых показателей в раневой жидкости (42).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность Астрид Филт Бейер (Astrid Filt Beyer), Каролин Улдаль Мартенсен (Caroline Uldahl Martensen), Камилл Мерседес Кранкер (Kamille Mercedes Kranker), Каролин Скри-Лассен (Karoline Skree-Lassen) и Лин Дамгаард Хенриксен (Line Damgaard Henriksen) за большую помощь в экстрагировании раневой жидкости и подготовке образцов, а также персоналу Центра протеомики Технического университета Дании за техническое обслуживание приборов.

Спонсор данного исследования — компания «Пауль Хартманн АГ». Ульрих ауф дем Келлер (Ulrich auf dem Keller) выражает признательность за получение стипендии для молодых исследователей (Young Investigator Award) от фонда компании «Ново Нордиск» (NNF16OC0020670) и «ПРО-МС» (PRO-MS): Датской национальной платформы масс-спектрометрии в области функциональной протеомики (грант №5072-00007B).

Конфликты интересов: Ханс Смола (Hans Smola) — постоянный штатный сотрудник компании «Хартманн». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patton D, Avsar P, Sayeh A, Budri A, O'Connor T, Walsh S, et al. A meta-review of the impact of compression therapy on venous leg ulcer healing. *Int Wound J* 2022; Jul 18. [Online ahead of print].
2. O'Meara S, Cullum N, Nelson EA, Dumville JC. Compression for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 11: CD000265.
3. Marston WA, Ennis WJ, Lantis JC, Kirsner RS, Galiano RD, Vanscheidt W, et al. Baseline factors affecting closure of venous leg ulcers. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 2017; 5: 829-835.e1.
4. Kantor J, Margolis DJ. A multicentre study of percentage change in venous leg ulcer area as a prognostic index of healing at 24 weeks. *Br J Dermatol* 2000; 142: 960-964.
5. Guest JF, Fuller GW, Vowden P. Venous leg ulcer management in clinical practice in the UK: costs and outcomes. *Int Wound J* 2018; 15: 29-37.
6. Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, Horan M, McCollum C, Ferguson M. Up-regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation. *Lab Invest* 1997; 77: 281-288.
7. Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K, et al. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 12-18.
8. Buchstein N, Hoffmann D, Smola H, Lang S, Paulsson M, Niemann C, et al. Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair. *Am J Pathol* 2009; 174: 2116-2128.
9. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 321-325.
10. Trøstrup H, Lundquist R, Christensen LH, Jorgensen LN, Karlsmark T, Haab BB, et al. S100A8/A9 deficiency in non-healing venous leg ulcers uncovered by multiplexed antibody microarray profiling. *Br J Dermatol* 2011; 165: 292-301.
11. Harris IR, Yee KC, Walters CE, Cunliffe WJ, Kearney JN, Wood EJ, et al. Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. *Exp Dermatol* 1995; 4: 342-349.
12. Stacey MC, Phillips SA, Farrokhyar F, Swaine JM. Evaluation of wound fluid biomarkers to determine healing in adults with venous leg ulcers: a prospective study. *Wound Repair Regen* 2019; 27: 509-518.
13. Eming SA, Koch M, Krieger A, Brachvogel B, Kreft S, Bruckner-Tuderman L, et al. Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *J Proteome Res* 2010; 9: 4758-4766.
14. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol* 1993; 53: 197-204.
15. Gallien S, Kim SY, Domon B. Large-scale targeted proteomics using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM). *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 1630-1644.
16. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinforma Oxf Engl* 2010; 26: 966-968.
17. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013; 310: 2191-2194.
18. Harding KG, Krieg T, Eming SA, Flour MLF, Jawien A, Cencora A, et al. Efficacy and safety of the freeze-dried cultured human keratinocyte lysate, LyphoDerm 0.9%, in the treatment of hard-to-heal venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 138-147.
19. Humbert P, Faivre B, Véran Y, Debure C, Truchetet F, Bécherel PA, et al. Protease-modulating polyacrylate-based hydrogel stimulates wound bed preparation in venous leg ulcers - a randomized controlled trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28: 1742-1750.
20. Chaby G, Senet P, Ganry O, Caudron A, Thuillier D, Debure C, et al. Prognostic factors associated with healing of venous leg ulcers: a multicentre, prospective, cohort study. *Br J Dermatol* 2013; 169: 1106-1113.
21. Kurd SK, Hoffstad OJ, Bilker WB, Margolis DJ. Evaluation of the use of prognostic information for the care of individuals with venous leg ulcers or diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 318-325.
22. Meaume S, Truchetet F, Cambazard F, Lok C, Debure C, Dalac S, et al. A randomized, controlled, double-blind prospective trial with a Lipido-Colloid Technology-Nano-OligoSaccharide Factor wound dressing in the local management of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2012; 20: 500-511.
23. Brölmann FE, Eskes AM, Goslings JC, Niessen FB, de Bree R, Vahl AC, et al. Randomized clinical trial of donor-site wound dressings after split-skin grafting. *Br J Surg* 2013; 100: 619-627.
24. Sabino F, Egli FE, Savickas S, Holstein J, Kaspar D, Rollmann M, et al. Comparative degradomics of porcine and human wound exudates unravels biomarker candidates for assessment of wound healing progression in trauma patients. *J Invest Dermatol* 2018; 138: 413-422.
25. Kirketerp-Møller K, Doerfler P, Schoefmann N, Wolff-Winiski B, Niazi O, Pless V, et al. Biomarkers of skin graft healing in venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol* 2022; 102: adv00749.
26. Thorey IS, Roth J, Regenbogen J, Halle JP, Bittner M, Vogl T, et al. The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem* 2001; 276: 35818-35825.
27. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Pro-inflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003; 170: 3233-3242.
28. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zelen MAD, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007; 13: 1042-1049.

29. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 442-452.
30. Trøstrup H, Holstein P, Christophersen L, Jørgensen B, Karlsmark T, Højby N, et al. S100A8/A9 is an important host defence mediator in neuropathic foot ulcers in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Dermatol Res* 2016; 308: 347-355.
31. Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70: 176-182.
32. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1334-1347.
33. Norgauer J, Hildenbrand T, Idzko M, Panther E, Bandemir E, Hartmann M, et al. Elevated expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membranetype matrix metalloproteinases in venous leg ulcers. *Br J Dermatol* 2002; 147: 1180-1186.
34. Mwaura B, Mahendran B, Hynes N, Defreitas D, Avalos G, Adegbola T, et al. The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31: 306-310.
35. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 642-648.
36. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 411-420.
37. Kirketerp-Møller K, Doerfler P, Schoefmann N, Wolff-Winski B, Niazi O, Pless V, et al. Biomarkers of skin graft healing in venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol* 2022; 102: adv00749.
38. Hsu K, Chung YM, Endoh Y, Geczy CL. TLR9 ligands induce S100A8 in macrophages via a STAT3-dependent pathway which requires IL-10 and PGE2. *PLoS One* 2014; 9: e103629.
39. Lee MJ, Lee JK, Choi JW, Lee CS, Sim JH, Cho CH, et al. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. *PLoS One* 2012; 7: e38801.
40. Xuan X, Li S, Lou X, Zheng X, Li Y, Wang F, et al. Stat3 promotes invasion of esophageal squamous cell carcinoma through upregulation of MMP2. *Mol Biol Rep* 2015; 42: 907-915.
41. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 2004; 23: 3550-3560.
42. Zillmer R, Trøstrup H, Karlsmark T, Ifversen P, Ågren MS. Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-8 levels and fibroblast activation. *Arch Dermatol Res* 2011; 303: 601-606.

Посетите информационный проект
компании HARTMANN

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ТЕРАПИИ РАН

i

Узнать больше:



HARTMANN



Помогает. Заботится. Защищает.

ООО «ПАУЛЬ ХАРТМАНН»
125167, г. Москва, вн. тер. г.
муниципальный округ Аэропорт,
пр-кт Ленинградский, д. 36, стр. 10.
Тел: +7 (495) 796 99 61
Факс: +7 (495) 796 99 60

ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА
ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ