



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.2.010>
УДК 616-001.4-089-06-097-091-071:616.9:579



Ярец Ю.И.✉, Жандаров М.Ю.

Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Особенности локального иммунного ответа в условиях инфекционного процесса острой и хронической раны: результаты иммуногистохимических исследований факторов клеточного иммунитета

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Ярец Ю.И. – идея исследования, концепция и планирование исследований, сбор материала, анализ и статистическая обработка результатов и их изложение, обсуждение и выводы, библиография, написание текста статьи; Жандаров М.Ю. – выполнение иммуногистохимических исследований и представление микрофотографий.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Гранта Президента Республики Беларусь в области здравоохранения (Распоряжение Президента Республики Беларусь от 19.01.2018 № 32рп «О предоставлении грантов Президента Республики Беларусь на 2018 год»; письмо Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 20.01.2018 № 14-12/896 «О направлении распоряжения Президента Республики Беларусь»).

Подана: 14.02.2023

Принята: 02.05.2023

Контакты: artutyut@mail.ru

Резюме

Цель. Осуществить иммуногистохимические исследования факторов клеточного иммунитета в биоптатах острых и хронических ран с учетом клинко-микробиологических характеристик раневой поверхности.

Материалы и методы. Выполнен анализ относительного содержания (%) CD3+ (Т-лимфоциты), CD4+ (Т-хелперы) и CD8+ (Т-цитотоксические лимфоциты), CD20+ (В-лимфоциты), CD138+ (плазмциты), CD68+ (макрофаги), CD15+ (нейтрофилы), CD34+ (эндотелий сосудов), CD57+ (натуральные киллеры), d2-40 (лимфатический эндотелий), Ki 67+ (маркер пролиферации), каспаза 3+ (маркер апоптоза), S100 (маркер воспаления), COX-2 (маркер воспаления) клеток по результатам иммуногистохимического исследования биоптатов грануляционной ткани пациентов с острыми ранами (ОР, n=30, срок раны от 5 до 21 суток) и хроническими ранами (ХР, n=120, срок раны более 3 недель). Оценивали также клинический статус раны на предмет наличия признаков воспаления и выполняли микробиологический посев раневого отделяемого.

Результаты. Более высокие значения иммунорегуляторного индекса (отношение CD4+/CD8+) и маркера пролиферации Ki 67+ регистрировались в острых ранах сроком от 5 до 21 суток, более низкие – в хронических ранах сроком более 22 суток и существенно не изменялись в зависимости от клинко-микробиологического состояния ран. Дополнительным признаком локального иммунного ответа являлось количество нейтрофилов, преобладающее в хронических ранах. Воспалительный статус ран и присутствие микроорганизмов, переход от стадии колонизации

к стадии критической колонизации и инфекции характеризовались увеличением относительного содержания в ранах Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций (CD4+ и CD8+ клеток), В-лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов, более высокими значениями S100 и COX-2. При выделении из хронических ран монокультур *S. aureus* в биоптатах в меньшем количестве обнаруживались В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги по сравнению с их содержанием в ранах, в которых этиологическими факторами инфекционного процесса были *P. aeruginosa* и *A. baumannii*.

Выводы. Определение клеточных факторов локального иммунитета является перспективным направлением для дифференциальной диагностики острой и хронической раны, а особенности их изменения позволяют установить стадию инфекционного процесса.

Ключевые слова: иммуногистохимическое исследование ран, раневой процесс, инфекционный процесс, ассоциативная микробиота, острая рана, хроническая рана

Yuliya I. Yarets✉, Mikhail Y. Zhandarov

Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Features of the Local Immune Response in the Infectious Process of Acute and Chronic Wounds: Results of Immunohistochemical Studies of Cellular Immunity Factors

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Yuliya I. Yarets – research idea, research concept and design, material collection, results analysis, statistical processing and presentation, discussion and conclusions, bibliography, text writing; Mikhail Y. Zhandarov – immunohistochemical studies conducting and microphotographs presentation.

Funding. The study was carried out within the framework of the Grant of the President of the Republic of Belarus in the field of healthcare (Decree of the President of the Republic of Belarus dated January 19, 2018 No. 32pn "On the provision of grants by the President of the Republic of Belarus for 2018"; Letter of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated January 20, 2018 No. 14-12 / 896 "On the direction of the order of the President of the Republic of Belarus").

Submitted: 14.02.2023

Accepted: 02.05.2023

Contacts: artyut@mail.ru

Abstract

Purpose. To analyze the results of immunohistochemical studies of biopsy specimens from acute and chronic wounds taking into account their clinical and microbiological characteristics.

Materials and methods. The relative content (%) of CD3+ (T-lymphocytes), CD4+ (T-helpers) and CD8+ (T-cytotoxic lymphocytes), CD20+ (B-lymphocytes), CD138+ (plasmocytes), CD68+ (macrophages), CD15+ (neutrophils), CD34+ (vascular endothelium), CD57+ (natural killer cells), d2-40 (lymphatic endothelium), Ki 67+ (proliferation marker), caspase 3+ (apoptosis marker), S100 (inflammatory marker), COX-2 (inflammatory marker) cells was analyzed according to the results of immunohistochemical study of granulation tissue biopsy specimens from patients with acute wounds (n=30, wound duration from



5 to 21 days) and chronic wounds (n=120, wound duration more than 3 weeks). The clinical status of the wound was also assessed for signs of inflammation, and microbiological culture of wound swabs was performed.

Results. Higher values of the immunoregulatory index (the ratio of CD4+/CD8+ lymphocytes) and the proliferation marker Ki 67 were recorded in acute wounds for a period of 5 to 21 days, lower values – in chronic wounds for a period of more than 22 days, and did not significantly change depending on the clinical and microbiological state of wounds. An additional feature was the number of neutrophils predominating in chronic wounds. The inflammatory status of wounds and the presence of microorganisms, as well as switch from colonisation stage to critical colonisation and infection stage were characterised by an increase in T-lymphocytes relative content and their major subpopulations (CD4+ and CD8+ cells), B-lymphocytes, neutrophils and macrophages, higher values of S100 and COX-2 in wounds. When *S. aureus* monocultures were isolated from chronic wounds, B-lymphocytes, natural killer cells and macrophages were lower in biopsy specimens compared to their content in wounds in which *P. aeruginosa* and *A. baumannii* were etiologic factors of the infectious process.

Conclusions. Immunohistochemical cell markers are promising objective criteria for differential diagnosis of acute and chronic wounds, allowing to establish the infectious process stage.

Keywords: immunohistochemical study of wounds, wound process, infectious process, associative microbiota, acute wound, chronic wound

■ ВВЕДЕНИЕ

Репарация поврежденной ткани раневой поверхности является одним из самых сложных биологических процессов и осуществляется при взаимодействии различных тканевых структур, внеклеточных матричных молекул и большого количества клеток резидентных и инфильтрирующих типов. На современном этапе в хирургической практике принято разделение понятий «острая рана» и «хроническая рана» с целью определения дальнейшей тактики лечения [1, 2]. В связи с этим актуальным является анализ морфологических особенностей течения раневого процесса этих двух клинических категорий ран, клеточные параметры которого будут перспективными объективными критериями их дифференциальной диагностики. Одной из основных первопричин стагнации раневого процесса является микробный фактор. Патогенные и персистентные свойства микроорганизмов, их способность формировать биопленку создают дисбаланс в работе иммунной системы и нарушают нормальное течение воспалительной и пролиферативной фаз раневого процесса [1, 3]. Для определения объема лечебных мероприятий – применения различных методов дебридмента (механического, физического), системной антибактериальной терапии – имеет значение установление стадии инфекционного процесса в ране: контаминация, колонизация, критическая колонизация, инфекция. Эти стадии отражают функциональные взаимоотношения «макросимбионт (хозяин) / ассоциативные микроорганизмы (патогены)» [4], когда при контаминации микроорганизмы присутствуют без активной репликации и эффективно удаляются посредством фагоцитоза;

при колонизации микробы поддерживают воспаление, нарушают механизмы пролиферации и приводят к задержке заживления. Критическая колонизация является пограничным состоянием, когда рана на нахождение микробов реагирует первыми клиническими признаками воспаления, а стадия инфекции сопровождается активным размножением бактерий и явными местными (при локальной инфекции) и системными (при системной инфекции) клиническими признаками [5, 6]. Учитывая трудности в определении этих стадий, и особенно в установлении момента перехода одной стадии в другую [7], представляет практический интерес анализ особенностей местных клеточных изменений в ране в условиях инфекционного процесса.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Осуществить иммуногистохимические исследования факторов клеточного иммунитета в биоптатах острых и хронических ран с учетом клинико-микробиологических характеристик раневой поверхности.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились результаты иммуногистохимического исследования образцов грануляционной ткани ран пациентов, которые находились на лечении в ожоговом отделении ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 1» в период 2012–2020 гг. В зависимости от давности существования раны пациентов разделяли на острые ($n=30$, срок раны от 5 до 21 суток) и хронические ($n=120$, срок раны более 3 недель). В связи с наличием клинических признаков воспаления, присутствием признаков патологических изменений грануляционной ткани у пациентов выполнялось микробиологическое исследование раневого отделяемого согласно разработанным рекомендациям. Посев проводили секторным методом с последующим предоставлением результата в КОЕ/мл. Также учитывали микроорганизмы, выделенные качественным методом из среды обогащения. Дополнительно оценивали комплекс генотипических и фенотипических признаков, определяющих патогенный и персистентный потенциал бактерий [8]. С учетом полученных положительных результатов посевов в хронических ранах устанавливали основные состояния, определяющие стадии инфекционного процесса: колонизацию ($n=39$), критическую колонизацию ($n=37$) и инфекцию ($n=29$). Для дифференциации стадий инфекционного процесса использовали ранее установленные нами клинико-микробиологические и морфологические критерии [9, 10]. У 15 пациентов с хроническими ранами, не имеющими явного воспалительного статуса, из раневого отделяемого не высевались микроорганизмы. Среди пациентов с острыми ранами у 15 человек наблюдались клинические признаки воспаления (гиперемия кожи, локальная гипертермия, отек мягких тканей), результаты микробиологического посева раневого отделяемого были положительными. У 15 пациентов признаки воспаления отсутствовали, из них у 5 пациентов результаты посевов были отрицательными, у 10 пациентов из ран высевались монокультуры и ассоциации микроорганизмов.

Для осуществления иммуногистохимического исследования производили биопсию дна и краев раны. Биопсийный материал фиксировали в растворе формалина (100 г/л), затем заливали в парафин по стандартной методике и готовили срезы парафиновых блоков толщиной 4 мкм (использован микротом Thermo Scientific Microm HM 360, Германия). Серийные срезы депарафинировали по стандартной схеме



и монтировали на предметные стекла с высокоадгезивным покрытием (Thermo Scientific/Menzel-Gläser Adhesion Slides SuperFrost, Германия, монтирующая среда Biomount, BioOptica, Италия).

Для иммуногистохимического исследования применялись антитела производства Diagnostic Biosystems (США): CD68 – для обнаружения макрофагов; CD15 – для нейтрофилов; CD34 – для эндотелия сосудов; CD3 – для Т-лимфоцитов; CD4 и CD8 – для Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов соответственно; CD20 – для В-лимфоцитов; CD57 – для обнаружения натуральных киллеров; d2-40 – для лимфатического эндотелия; CD138 – маркер плазматических клеток; Ki 67 – маркер пролиферации; каспаза 3 – маркер апоптоза; S100 – использован в качестве маркера воспаления; COX-2 (циклооксигеназа 2) – маркер воспаления. Исследование выполняли с использованием автоматического иммуногистостейнера Roche Ventana BenchMark (Roche Diagnostics, Германия). С целью контроля метода проведена серия исследований с использованием позитивных и негативных образцов. Для позитивного контроля к антителам CD3, CD20, CD57 и CD68 использовалась ткань миндалин, к CD34 – ткань ангиосаркомы, к S100 – ткань меланомы, к Ki 67 – срез лимфатического узла с реактивной гиперплазией, к d2-40 – ткань лимфангиомы. Для морфометрического исследования использовался аппаратно-программный комплекс Nikon (микроскоп Nikon Eclipse 50i с цифровой фотокамерой DS-F1) с программным обеспечением NIS-Elements. Микропрепараты фотографировали на увеличении $\times 200$ и $\times 400$. Оценка экспрессии антител проводилась полуколичественным методом исходя из числа иммунопозитивных клеток на 100 клеток инфильтрата, результат выражали в процентах; для CD34 и d2-40 – в количестве позитивных капилляров в поле зрения $\times 400$.

Иммуногистохимическое и микробиологическое исследование выполняли в патологоанатомическом и бактериологическом отделах лаборатории клеточных технологий ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека». В работе применены общепринятые методы выражения результатов с использованием встроенных графических модулей системы STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США, регистрационный номер GS-35F-5899H). Распределение количественных признаков представлено методом описательной статистики в виде Ме – медиана и 25% – нижний квартиль, 75% – верхний квартиль. Для сравнения показателей независимых выборок использовался ранговый U-критерий Манна – Уитни. Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли H-критерий Краскела – Уоллиса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно полученным результатам микробиологического посева хронические раны пациентов были колонизированы *S. aureus* ($n=13$), *P. aeruginosa* ($n=6$), а также ассоциациями бактерий ($n=20$). Ассоциации главным образом были представлены сочетаниями грамположительных и грамотрицательных бактерий, среди которых – *E. faecalis*, коагулазонегативные стафилококки, *S. aureus*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Streptococcus* gr. *viridans*. У пациентов с критически колонизированными ранами также обнаруживались монокультуры *S. aureus* ($n=11$), неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФБ) – *P. aeruginosa* ($n=7$) и *A. baumannii* ($n=2$), бактериальные ассоциации ($n=17$) (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, коагулазонегативные стафилококки, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*). Из хронических ран, имеющих признаки

инфекции, были выделены *S. aureus* (n=4), НФБ (*P. aeruginosa*, n=1; *A. baumannii*, n=5). Видовой состав ассоциаций (n=19) был аналогичен таковому в критически колонизированных ранах.

У 15 пациентов с острыми ранами, у которых наблюдались клинические признаки воспаления, из раневого отделяемого высевались монокультуры *S. aureus* (n=5), *P. aeruginosa* (n=3), *P. mirabilis* (n=2) и 5 ассоциаций, состоящих из грамотрицательных энтеробактерий, НФБ и грамположительных *E. faecalis* и *S. aureus*. У 10 пациентов с острыми ранами, не имеющих в ранах воспалительного статуса, выделялись коагулазонегативные стафилококки (n=4), *E. faecalis* (n=3), а также ассоциации (n=3), представленные *S. aureus*, *E. faecalis* и *E. coli*.

Результаты иммуногистохимического исследования выявили ряд различий в содержании клеток основных типов в биоптатах острых и хронических ран пациентов (см. таблицу).

В хронических ранах регистрировались более низкие показатели Т-цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов (CD8+ и CD4+ клетки соответственно). Значения иммунорегуляторного индекса (отношение CD4+/CD8+ клеток) также были

Результаты иммуногистохимического исследования биоптатов ран
Results of immunohistochemical study of wound biopsy specimens

Клеточный маркер, % иммунопозитивных клеток на 100 клеток инфильтрата; количество (n) позитивных капилляров в поле зрения	Пациенты с остры- ми ранами (n=30), Me % (25%; 75%)	Пациенты с хрони- ческими ранами (n=120), Me % (25%; 75%)	Значимость раз- личий по тесту Манна – Уитни
CD3 (Т-лимфоциты), %	25,0 (20,0; 30,0)	23,0 (20,0; 30,0)	Z=1,15; p=0,25
CD8 (Т-цитотоксические лимфоци- ты), %	14,0 (12,0; 16,0)	12,0 (9,5; 14,0)	Z=3,46; p<0,001
CD4 (Т-хелперы), %	65,0 (55,0; 75,0)	35,5 (29,5; 40,0)	Z=8,27; p<0,001
ИРИ (иммунорегуляторный индекс CD4+/CD8+)	4,8 (4,2; 5,3)	3,0 (2,7; 3,5)	Z=7,85; p<0,001
CD20 (В-лимфоциты), %	12,5 (10,0; 16,0)	12,0 (10,0; 14,0)	Z=1,96; p=0,05
CD57 (натуральные киллеры), %	6,5 (5,0; 8,0)	7,0 (6,0; 8,5)	Z=1,67; p=0,09
CD68 (макрофаги), %	20,0 (16,0; 23,0)	23,0 (20,0; 26,0)	Z=2,83; p=0,005
CD138 (плазматические клетки), %	0,0 (0,0; 1,0)	3,0 (2,0; 5,0)	Z=6,61; p<0,001
CD34 (эндотелий кровеносных сосудов), n	15,0 (12,0; 19,0)	13,0 (10,0; 17,5)	Z=1,34; p=0,17
CD15 (нейтрофилы), %	15,0 (8,0; 24,0)	28,0 (24,0; 32,0)	Z=6,24; p<0,001
d2-40 (эндотелий лимфатических сосудов), n	2,0 (1,0; 2,0)	4,0 (3,0; 5,0)	Z=6,92; p<0,001
S100 (маркер воспаления), %	6,0 (5,0; 8,0)	8,0 (7,0; 10,0)	Z=4,21; p<0,001
Каспаза 3 (маркер апоптоза), %	7,0 (2,0; 9,0)	4,0 (2,0; 5,0)	Z=2,59; p=0,009
Ki 67 (маркер пролиферации), %	7,0 (6,0; 8,0)	3,0 (2,0; 4,0)	Z=8,27; p<0,001
COX-2 (маркер воспаления), %	5,0 (4,0; 8,0)	6,0 (5,0; 8,0)	Z=2,42; p=0,015

Примечание: жирным шрифтом выделены значимые различия в показателях.



ниже, чем в острых ранах. В большем количестве в хронических ранах обнаруживались нейтрофильные лейкоциты (CD15+ клетки), макрофаги (CD68+ клетки) и плазматические клетки (CD138+), а также маркер лимфоангиогенеза – d2-40, который экспрессируется на лимфатическом эндотелии. В свою очередь, в острых ранах регистрировались более высокие значения клеток, позитивных по маркеру пролиферации Ki 67, но более низкие значения клеток, позитивных по маркерам воспаления (S100, COX-2) и апоптоза (каспаза 3), чем в хронических ранах (см. таблицу).

Выявлены внутригрупповые различия клеточного состава биоптатов в зависимости от клинично-микробиологического состояния острых и хронических ран. У пациентов с острыми ранами, имеющими клинические признаки воспаления (гиперемия кожи, локальная гипертермия, отек мягких тканей) и положительный результат микробиологического посева раневого отделяемого, биоптаты грануляционной ткани ран характеризовались наиболее высокими значениями Т-лимфоцитов (CD3+) – 30,0 (25,0; 40,0)%, Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+) – 16,0 (14,0; 20,0)%, Т-хелперов (CD4+) – 75,0 (75,0; 80,0)%, В-лимфоцитов (CD20+) – 16,0 (13,0; 18,0)%, макрофагов (CD68+) – 22,0 (19,0; 28,0)% и нейтрофилов (CD15+) – 24,0 (16,0; 28,0)%

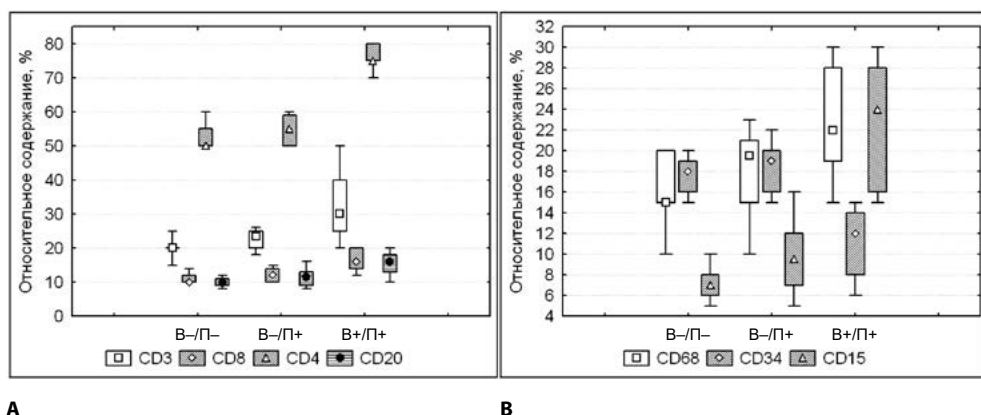


Рис. 1. Показатели иммуногистохимического исследования в зависимости от клинично-микробиологического состояния острых ран

Примечания: представлены показатели, имеющие значимые различия в зависимости от клинично-микробиологического статуса раны (использован расчет H-критерия Краскела – Уоллиса): CD3 (H=11,9; p<0,001), CD8 (H=16,8; p<0,001), CD4 (H=22,4; p<0,001), CD20 (H=12,6; p<0,001), CD68 (H=7,3; p=0,026), CD34 (H=21,5; p<0,001), CD15 (H=20,94; p<0,001). B+/B-: обозначения для ран, имеющих клинические признаки воспаления / не имеющих таких признаков; П+/П-: обозначения для положительных/отрицательных результатов микробиологического посева раневого отделяемого.

Fig. 1. Indicators of immunohistochemical studies depending on the clinical and microbiological state of acute wounds

Notes: parameters are presented having significant differences depending on the clinical and microbiological status of the wound (the Kruskal-Wallis H-test calculation was used): CD3 (H=11.9; p<0.001), CD8 (H=16.8; p<0.001), CD4 (H=22.4; p<0.001), CD20 (H=12.6; p<0.001), CD68 (H=7.3; p=0.026), CD34 (H=21.5; p<0.001), CD15 (H=20.94; p<0.001). B+/B-: designation for wounds with/without clinical signs of inflammation; П+/П-: designations for positive/negative results of microbiological culture of wound swabs.

($p < 0,001$) (рис. 1А и 1В). При отсутствии воспалительного статуса в острых ранах у пациентов как с положительным, так и с отрицательным результатом посева раневого отделяемого показатели Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов существенно не различались. При этом в этих ранах в большем количестве, чем в ранах, имеющих признаки воспаления, обнаруживались кровеносные микрососуды (CD34+) – 19,0 (16,0; 20,0) капилляра в поле зрения (рис. 1В). В меньшей степени проявлялись дополнительные воспалительные маркеры: S100 – 4,0 (5,0; 6,0)% (H=9,9; $p < 0,01$), COX-2 – 4,0 (3,0; 4,0)% позитивных клеток (H=17,8; $p < 0,001$), а также маркеры апоптоза: каспаза 3 – 2,0 (1,0; 3,0)% позитивных клеток (H=22,3; $p < 0,001$).

У пациентов с хроническими ранами наиболее высокими показателями CD3+, CD8+, CD4+, CD20+, CD68+, CD138+, CD15+ клеток характеризовались критически колонизированные и инфицированные раны ($p < 0,01$) (рис. 2А и 2В). При этом в хронических ранах, имеющих клинические признаки инфекционного воспаления, максимальными были значения Т-лимфоцитов – 31,0 (24,0; 35,0)% (Z=2,8; $p = 0,005$), Т-хелперов – 45,0 (41,0; 50,0)% (Z=5,7; $p < 0,001$) и нейтрофилов – 34,0 (31,0; 36,0)%

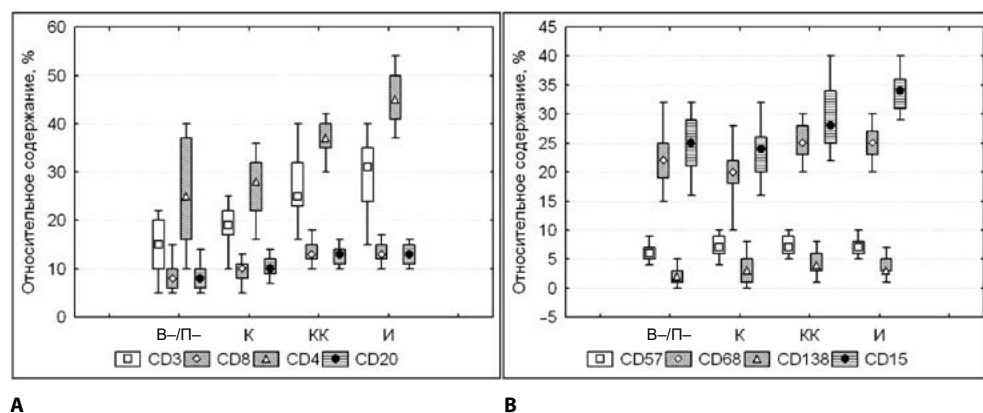


Рис. 2. Показатели иммуногистохимического исследования в зависимости от клинко-микробиологического состояния хронических ран

Примечания: представлены показатели, имеющие значимые различия в зависимости от клинко-микробиологического статуса раны (использован расчет H-критерия Краскела – Уоллиса): CD3 (H=54,4; $p < 0,001$), CD8 (H=70,0; $p < 0,001$), CD4 (H=80,1; $p < 0,001$), CD20 (H=45,4; $p < 0,001$), CD57 (H=11,6; $p = 0,01$), CD68 (H=42,3; $p < 0,001$), CD138 (H=13,9; $p < 0,01$), CD15 (H=57,4; $p < 0,001$). B-: обозначение для ран, не имеющих клинических признаков воспаления; П-: обозначение для отрицательных результатов микробиологического посева раневого отделяемого; K, KK, И – колонизированные, критически колонизированные, инфицированные раны соответственно.

Fig. 2. Indicators of immunohistochemical studies depending on the clinical and microbiological state of chronic wounds

Notes: parameters are presented having significant differences depending on the clinical and microbiological status of the wound (the Kruskal-Wallis H-test calculation was used): CD3 (H=54.4; $p < 0.001$), CD8 (H=70.0; $p < 0.001$), CD4 (H=80.1; $p < 0.001$), CD20 (H=45.4; $p < 0.001$), CD57 (H=11.6; $p = 0.01$), CD68 (H=42.3; $p < 0.001$), CD138 (H=13.9; $p < 0.01$), CD15 (H=57.4; $p < 0.001$). B-: designation for wounds without clinical signs of inflammation; P-: designation for negative results of microbiological culture of wound swabs; K, KK, I – colonized, critically colonized, infected wounds, respectively.

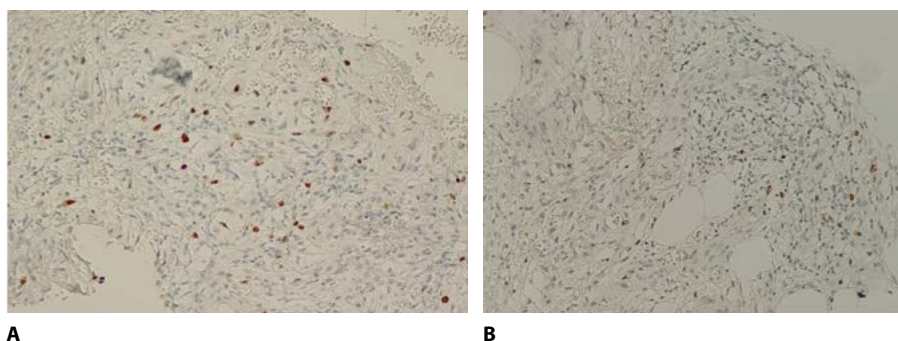


Рис. 3. Иммуногистохимическая картина экспрессии маркера Ki 67. А – экспрессия маркера пролиферации Ki 67 составляет 8% клеток инфильтрата грануляционной ткани. Биоптат острой раны (воспаление отсутствует, результат микробиологического посева отрицательный). В – экспрессия маркера пролиферации Ki 67 составляет 4% клеток инфильтрата грануляционной ткани. Биоптат хронической раны, стадия колонизации
Fig. 3. Immunohistochemical pattern of Ki 67 marker expression. А – expression of the proliferation marker Ki 67 is 8% of the cells in the granulation tissue infiltrate. Acute wound biopsy specimen (no inflammation, negative microbiological culture). В – expression of the proliferation marker Ki 67 is 4% of cells in the granulation tissue infiltrate. Chronic wound biopsy specimen, colonization stage

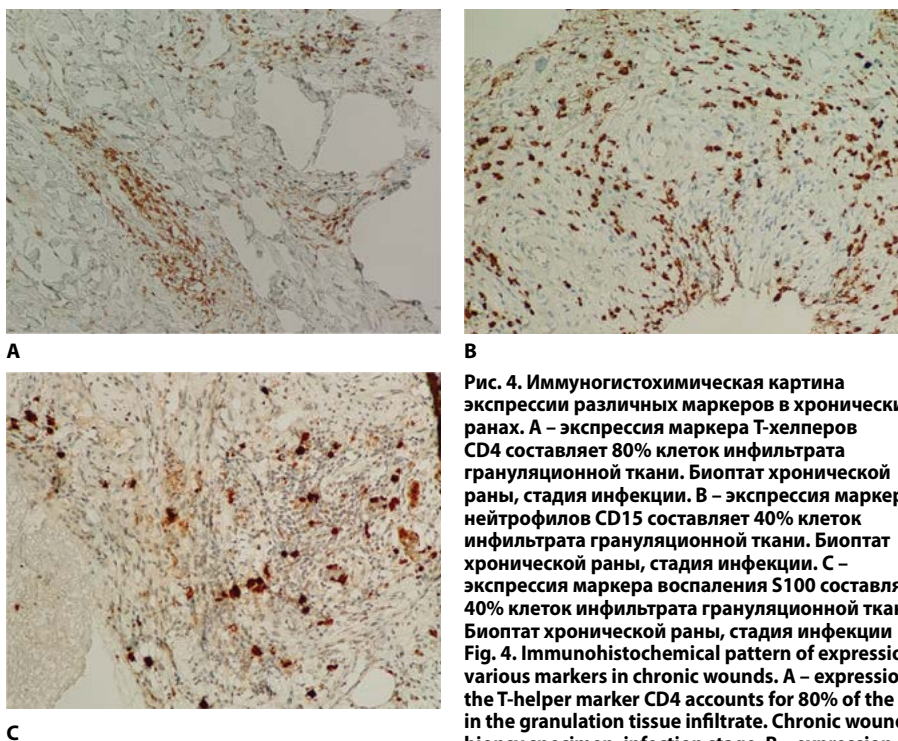


Рис. 4. Иммуногистохимическая картина экспрессии различных маркеров в хронических ранах. А – экспрессия маркера Т-хелперов CD4 составляет 80% клеток инфильтрата грануляционной ткани. Биоптат хронической раны, стадия инфекции. В – экспрессия маркера нейтрофилов CD15 составляет 40% клеток инфильтрата грануляционной ткани. Биоптат хронической раны, стадия инфекции. С – экспрессия маркера воспаления S100 составляет 40% клеток инфильтрата грануляционной ткани. Биоптат хронической раны, стадия инфекции
Fig. 4. Immunohistochemical pattern of expression of various markers in chronic wounds. А – expression of the T-helper marker CD4 accounts for 80% of the cells in the granulation tissue infiltrate. Chronic wound biopsy specimen, infection stage. В – expression of the neutrophil marker CD15 makes up 40% of the cells of the granulation tissue infiltrate. Chronic wound biopsy specimen, infection stage. С – expression of the inflammatory marker S100 accounts for 40% of the cells in the granulation tissue infiltrate. Chronic wound biopsy specimen, infection stage

($Z=3,8$; $p<0,001$). Остальные клеточные показатели в критически колонизированных и инфицированных ранах были практически одинаковыми и составляли в целом: CD8+ – 13,0 (12,0; 15,0)%, CD20+ – 13,0 (11,0; 14,0)%, CD68+ – 25,0 (23,0; 28,0)%, CD138+ – 4,0 (3,0; 5,0)%. Воспалительный статус хронических ран (критическая колонизация и инфекция) также сопровождался более высокими значениями маркеров воспаления: S100 – 8,0 (7,0; 10,0)% ($H=20,9$; $p<0,001$) и COX-2 – 7,0 (5,0; 8,0)% позитивных клеток ($H=12,5$; $p=0,006$).

При отсутствии в хронических ранах клинических признаков воспаления изменения ряда клеточных показателей определялись наличием или отсутствием микробиоты в ранах. Так, колонизация раны микроорганизмами сопровождалась более высокими значениями Т-лимфоцитов – 20,0 (18,0; 22,0)% ($Z=3,4$; $p<0,001$), Т-цитотоксических лимфоцитов – 10,0 (8,0; 11,0)% ($Z=2,0$; $p=0,04$), В-лимфоцитов – 10,0 (9,0; 12,0) ($Z=2,6$; $p=0,008$), натуральных киллеров – 7,0 (6,0; 9,0) ($Z=2,5$; $p=0,01$). Относительное количество клеток, позитивных по маркеру воспаления S100, также было больше в колонизированных ранах – 8,0 (7,0; 10,0)% ($Z=3,9$; $p<0,001$). В случаях отсутствия выделения из хронических ран микроорганизмов биоптаты грануляционной ткани характеризовались минимальными значениями Т-лимфоцитов – 15 (10,0; 20,0)%, Т-цитотоксических лимфоцитов – 8,0 (6,0; 10,0)%, Т-хелперов – 25,0 (16,0; 37,0)%, В-лимфоцитов – 8,0 (6,0; 10,0)%, натуральных киллеров – 6,0 (5,0; 7,0)% и плазматических клеток – 2,0 (1,0; 3,0)%, S100 позитивных клеток – 6,0 (5,0; 7,0)% среди всех сравниваемых подгрупп пациентов с хроническими ранами (рис. 2А и 2В).

Таким образом, иммуногистохимическое исследование показало, что основной отличительной особенностью ран различных сроков давности являются показатели иммунорегуляторного индекса (отношение CD4+/CD8+ лимфоцитов) и маркера пролиферации Ki 67, более высокие значения которых регистрируются в острых ранах сроком от 5 до 21 дня (рис. 3А), более низкие – в хронических ранах сроком более 22 дней (рис. 3В) и существенно не изменяются в зависимости от клинико-микробиологического состояния ран. Дополнительным признаком является количество нейтрофилов, которые преобладали в хронических ранах.

Воспалительный статус ран и присутствие микроорганизмов, переход от стадии колонизации к стадии критической колонизации и инфекции характеризовались увеличением относительного содержания в ранах Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций (CD4+ и CD8+ клеток), В-лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов, более высокими значениями маркеров воспаления S100 и COX-2. Примеры экспрессии перечисленных маркеров представлены на рис. 4.

Проанализированы результаты иммуногистохимического исследования в зависимости от качественного состава микробиоты ран, имеющих клинические признаки воспаления. В случаях выделения из хронических ран монокультур *S. aureus* ($n=15$) в биоптатах в меньшем количестве обнаруживались В-лимфоциты – 12,0 (11,0; 12,0)%, натуральные киллеры – 7,0 (5,0; 8,0)% и макрофаги – 24,0 (22,0; 25,0)%. В случаях, когда этиологией инфекционного процесса в хронической ране были грамотрицательные НФБ – *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ($n=14$), значения указанных клеток были выше: В-лимфоциты – 13,5 (12,0; 15,0)% ($Z=2,4$; $p=0,01$), натуральные киллеры – 8,0 (7,0; 9,0)% ($Z=2,0$; $p=0,04$) и макрофаги – 26,5 (24,0; 30,0)% ($Z=2,3$; $p=0,02$).



■ ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевую роль в нарушении процессов заживления раны играют микроорганизмы и вызываемые ими изменения со стороны механизмов иммунореактивности макроорганизма [11]. Соотношение между функциональным состоянием поврежденных тканей с одной стороны и патогенностью представленной микрофлоры с другой определяет также стадийность в развитии инфекционного процесса. Ряд различий в клеточном составе острых и хронических ран, выявленных с помощью представленного иммуногистохимического исследования, подтверждает наличие дисбаланса иммунных реакций и связь его с клинико-микробиологическими характеристиками раны.

Каскад перекрываемых стадий гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделирования характерен для нормального процесса регенерации острой раны, когда восстановление целостности ткани происходит за непродолжительный период времени (до 4 недель) [1]. Хронический раневой процесс характеризуется дефектом одной из фаз раневого заживления при сохранении последовательности. Наиболее часто репарация тормозится на этапе воспаления, которое в хронической ране приобретает патологический характер. Несмотря на отсутствие существенных различий в общем количестве Т-лимфоцитов (CD3+ клетки), у пациентов выявлены особенности соотношения их основных субпопуляций – Т-хелперов (CD4+) и Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+). Преобладание CD4+ лимфоцитов, высокие значения иммунорегуляторного индекса, составляющие 4,8 (4,2; 5,3), являются признаком нормального процесса заживления, что было установлено у пациентов с острыми ранами (см. таблицу). Известно, что Т-клетки появляются в ране в воспалительной фазе заживления, через 4 суток после повреждения, а их преобладающая субпопуляция Т-хелперов регулирует микросреду раны, секретируя различные профили цитокинов, необходимых для пролиферации фибробластов и последующего процесса ремоделирования раны [12]. В свою очередь, снижение иммунорегуляторного индекса (отношение CD4+/CD8+), обусловленное отсутствием повышения Т-хелперов и увеличением вклада в это отношение Т-цитотоксических лимфоцитов, является признаком нарушения процесса заживления и формирования хронической раны [13, 14]. Активация Т-клеточных механизмов происходит в ответ на развитие инфекционного процесса и включает дополнительное привлечение Т-хелперов 1-го и 17-го типов, хемоаттрактантами для которых являются провоспалительные цитокины макрофагов, главным образом интерферон гамма. Инфекция также сопровождается накоплением в ране нейтрофилов и макрофагов, которые осуществляют фагоцитоз патогенов, продуцируют активные формы кислорода, протеазы и цитокины. При этом избыточная инфильтрация раны активированными нейтрофилами, вызываемая бактериями-продуцентами биопленки, поддерживает воспаление, опосредует дополнительное повреждение тканей, тормозит заживление и является дополнительным биомаркером хронической раны. Это также доказывает выполненное исследование, по результатам которого, несмотря на наличие признаков воспаления и положительный результат микробиологического посева, степень накопления нейтрофилов в острых ранах во всех случаях была ниже, чем в хронических ранах (рис. 1 и 2). Увеличение клеточных показателей – Т-лимфоцитов и их субпопуляций, В-лимфоцитов, плазматических клеток, нейтрофилов и макрофагов, выявленное

при прогрессировании инфекционного процесса, отражает различную активность местной воспалительной реакции и дополнительно обосновывает необходимость дифференцировки стадий инфекционного процесса в хронической ране. В свою очередь, отсутствие различий в клеточных показателях в острых ранах, не имеющих признаков воспаления, является дополнительным критерием контаминации, когда наличие микроорганизмов не вызывает изменений со стороны основных иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов). При этом наиболее высокое количество кровеносных микрососудов (CD34+ клетки), выявленное только у этой категории пациентов (рис. 1В), указывает на нормальный процесс созревания грануляционной ткани. Известно, что колонизация раны бактериями-продуцентами биопленки приводит к нарушению процесса заживления и формированию хронической раны [2, 6]. Диагностическим признаком развития этого состояния может быть увеличение в ранах общего количества Т-лимфоцитов и Т-цитотоксических лимфоцитов, а также В-лимфоцитов и киллеров (рис. 2).

Известно диагностическое значение низкомолекулярного кальцийсвязывающего клеточного белка S100, который используется главным образом для патоморфологической диагностики меланомы. Однако показана возможность применения S100 не только при злокачественных заболеваниях, но и при широком спектре других патологий. Так, некоторые формы белка S100 синтезируются фагоцитами и выполняют различные функции, связанные с инфекционным воспалением [15, 16]. Фермент циклооксигеназа 2 (иммуногистохимический маркер COX-2) – универсальный маркер провоспалительного фенотипа клеток [17] – также используется в онкологии в ситуациях, где, помимо развития хронического воспалительного процесса, есть высокий онкологический потенциал клеток [18]. В представленном исследовании S100 и COX-2 рассматривались как дополнительные маркеры интенсивности воспалительного ответа в ранах в условиях инфекции. Выявлено различное количество S100 и COX-2 позитивных клеток в биоптатах ран пациентов в зависимости от клинических особенностей (отсутствия/наличия признаков воспаления) и стадии инфекционного процесса, что сочеталось с аналогичными изменениями со стороны клеточных маркеров воспаления и эффекторной каспазы 3. Маркер Ki 67, как правило, используется для оценки пролиферативной активности опухолевой ткани, коррелирует с гистологической степенью дифференцировки опухоли, определяет ее злокачественный потенциал [19]. Ассоциации этого ядерного белка с механизмами деления клетки позволяют использовать Ki 67 и в качестве перспективного маркера нарушений пролиферативной фазы раневого процесса. В исследовании Комелягиной Е.Ю. с соавт. (2017) установлена информативность Ki 67 с пороговым значением экспрессии 7% для прогнозирования пролиферативной активности грануляционной ткани и определения вероятности заживления раны у пациентов с синдромом диабетической стопы [20]. Ki 67 также может применяться в комплексе с другими маркерами для дифференцировки острой и хронической раны. Временной период, когда рану необходимо считать хронической и, соответственно, изменять подходы к ее лечению, является спорным. Различными авторами указываются сроки более 4 недель, более 6 недель, более 8 недель, более 3 месяцев [21–23]. Более низкие значения Ki 67 позитивных клеток 3,0 (2,0; 4,0)% были выявлены в ранах «пограничных» сроков существования от 22 до 28 суток наряду с другими различиями клеточных показателей – более низкими значениями иммунорегуляторного индекса



3,0 (2,7; 3,5) и избыточной инфильтрацией нейтрофилами (см. таблицу). Это может быть дополнительным критерием, позволяющим объективно выявить признаки хронизации раневого процесса в более ранние сроки, нежели 4 недели, и определить необходимость использования тактических подходов, применяемых в лечении хронических ран. Ранее нами также выполнялось гистологическое исследование ран, по результатам которого выявлены начальные морфологические признаки нарушений пролиферативной фазы репарации в ранах сроком от 22 до 28 суток [9].

В научной литературе продемонстрированы различия в параметрах заживления ран в условиях инфекции, вызванной различными видами бактерий. В экспериментальном исследовании установлено, что инфицирование *S. aureus* сопровождалось появлением многоядерных гигантских клеток, а *P. aeruginosa* – вакуолизацией макрофагов. Лимфо- и плазмоцитарная инфильтрация была в большей степени выражена при инфекции *P. aeruginosa*, чем при инфекции, вызванной монокультурой *S. aureus* или бактериальными ассоциациями [24]. Более низкие значения В-лимфоцитов, выявленные нами в ранах, инфицированных *S. aureus*, могут быть объяснены подавлением гуморального ответа стафилококковым протеином А (SpA), который вызывает истощение и анергию В-клеток [25]. Также известно, что *S. aureus*, особенно MRSA, для обеспечения собственного выживания подавляют эффероцитоз – важнейшую функцию макрофагов по обеспечению фагоцитарного клиренса апоптотических клеток, обуславливая прогрессирование инфекционного процесса [26]. Отмечают значение натуральных киллеров в процессе заживления ран в условиях инфицирования *P. aeruginosa*. Увеличение этих клеток необходимо для элиминации бактерий из раны [27]. В эксперименте доказано, что, несмотря на повышение количества нейтрофилов и макрофагов, в условиях отсутствия натуральных киллеров элиминация *P. aeruginosa* из раны была нарушена, что определяет обязательное участие этих клеток в процессе выживания нейтрофилов, активации макрофагов и фагоцитоза [27–29]. Выявленные различия в зависимости от видового состава микробиоты могут служить дополнительными критериями этиологической значимости и определения момента прогрессирования инфекционного процесса.

■ ВЫВОДЫ

1. Основной отличительной особенностью ран различных сроков давности являются показатели иммунорегуляторного индекса (отношение CD4+/CD8+ лимфоцитов) и маркера пролиферации Ki 67, более высокие значения которых регистрируются в острых ранах сроком от 5 до 21 суток, более низкие – в хронических ранах сроком более 22 суток (CD4+/CD8+ – 4,8 (4,2; 5,3), Ki 67 – 7,0 (6,0; 8,0) vs 3,0 (2,7; 3,5) и 3,0 (2,0; 4,0) соответственно, $p < 0,001$) и существенно не изменяются в зависимости от клинко-микробиологического состояния ран. Дополнительным признаком является количество нейтрофилов (CD15+), которые преобладали в хронических ранах и составляли 28,0 (24,0; 32,0)%, тогда как в острых ранах содержание CD15+ клеток было 15,0 (8,0; 24,0)% ($p < 0,001$).
2. Воспалительный статус ран и присутствие микроорганизмов, переход от стадии колонизации к стадии критической колонизации и инфекции характеризовались увеличением относительного содержания в ранах Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций (CD4+ и CD8+ клеток), В-лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов, более высокими значениями маркеров воспаления S100 и COX-2.

3. При выделении из хронических ран монокультур *S. aureus* в биоптатах в меньшем количестве обнаруживались В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги, по сравнению с ранами, в которых этиологией инфекционного процесса были *P. aeruginosa* и *A. baumannii*.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Raziyeva K., Kim Y., Zharkinekov Z. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*. 2021;11:700. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11050700>
2. Trøstrup H., Bjørnsholt T., Kirketerp-Møller K. What is new in the understanding of non healing wounds epidemiology, pathophysiology, and therapies. *Ulcers*. 2013;625934. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/625934>
3. Schilreiff P., Alexiev U. Chronic inflammation in non-healing skin wounds and promising natural bioactive compounds treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:4928. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23094928>
4. Bukharin O.V. Symbiotic interactions of microorganisms during infection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013;1:93–97. (in Russian)
5. Kramer A., Dissemmond J., Kim S., Willy C., Mayer D., Papke R., Tuchmann F., Assadian O. Consensus on wound antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31(1):28–58. Available at: <https://doi.org/10.1159/000481545>
6. International Wound Infection Institute (IWII) Wound Infection in Clinical Practice. *Wounds International*. 2022. Available at: <https://woundinfection-institute.com/wp-content/uploads/IWII-CD-2022-web-1.pdf> (accessed 14 February 2023).
7. Rodin A.V. Choice of local antiseptic for treatment and prevention of wound infection. hospital-replacing technologies. *Hospital-replacing technologies: Ambulatory surgery*. 2019;3:4–47–56. Available at: <https://doi.org/10.21518/1995-1477-2019-3-4-47-56>. (in Russian)
8. Yarets Y.I., Shevchenko N.I., Eremin V.F. Methodology of microbiological analysis of wound swabs within the framework of modern concepts of wound infection process. *Laboratory Service*. 2021;10(3):33–42. Available at: <https://doi.org/10.17116/labs20211003133>. (in Russian)
9. Yarets Yu.I., Slavnikov I.A., Dundarov Z.A. Colonized, critically colonized and infected wounds: differentiation using clinical and microbiological and morphological methods of investigation. *Health and Ecology Issues*. 2022;19(2):63–75. Available at: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2022-19-2-08>
10. Yarets Yu.I., Shevchenko N.I., Slavnikov I.A. Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology. Method for quantitative determination of the microbiota of wound swab and assessment of its etiological significance. Instructions for use BY № 013-0422. 23.12.2022. Gomel. 2022; 17 p. (in Russian)
11. Wu Y.K., Cheng N.C., Cheng C.M. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. *Trends in biotechnology*. 2019;37(5):505–517. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.011>
12. Short W.D., Wang X., Keswani S.G. The role of T lymphocytes in cutaneous scarring. *Advances in wound care*. 2022;11(3):121–131. Available at: <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0059>
13. Loots M.A., Lamme E.N., Zeegelaar J. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J. Invest. Dermatol.* 1998;111(5):850–857. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x>
14. Rani M., Schwacha M.G. The composition of T-cell subsets are altered in the burn wound early after injury. *PLoS ONE*. 2017;12(6):e0179015. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179015>
15. Beloborodova N.V., Dmitriyeva I.B., Chernevskaya E.A. Diagnostic Value of S100B Protein in Critical Conditions. *General Reanimatology*. 2011;VII(6):72–76. Available at: <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2011-6-72>. (in Russian)
16. Abtin A., Eckhart L., Gläser R. The Antimicrobial Heterodimer S100A8/S100A9 (Calprotectin) is Upregulated by Bacterial Flagellin in Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2010;130:2423–2430. Available at: <https://doi.org/10.1038/jid.2010.158>
17. Suzdal'tseva Y.G., Buranova V.V., Petrakova N.V. Comparative analysis of cytophenotypes of cells of mesenchymal lineage isolated from human tissues. *Bull Exp Biol Med*. 2007;143(1):147–54. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0037-7>. (in Russian)
18. Zelenay S., Reis E., Sousa C. Reducing prostaglandin E2 production to raise cancer immunogenicity. *Oncoimmunology*. 2016;5(5):e1123370. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1123370>
19. Inwald E.C., Klinkhammer-Schalke M., Hofstädter F. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539–552. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2560-8>
20. Komelyagina E.Y., Kogan E.A., Antsiferov M.B. Clinical and morphological characteristics of wound healing in diabetic foot syndrome. *Diabetes mellitus*. 2017;20(2):135–141. Available at: <https://doi.org/10.14341/7704>. (in Russian)
21. Gibson D.J., Schultzf G. Chronic wound diagnostic for matrix metalloproteinase. *Wound healing Southern Africa*. 2009;2(2):68–70.
22. Dissemmond J., Augustin M., Eming S.A. Modern wound care – practical aspects of non-interventional topical treatment of patients with chronic wounds. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014;12:541–54. Available at: <https://doi.org/10.1111/ddg.12351>
23. Saltmarche A.E. Low level laser therapy for healing acute and chronic wounds – the extendicare experience. *International Wound Journal*. 2008;5(2):351–360. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2008.00491.x>
24. Chaney S.B., Ganesh K., Mathew-Steiner S. Histopathological comparisons of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa experimental infected porcine burn wounds. *Wound Repair Regen*. 2017;25(3):541–549. Available at: <https://doi.org/10.1111/wrr.12527>
25. Pozzi C., Lofano G., Mancini F. Phagocyte subsets and lymphocyte clonal deletion behind ineffective immune response to Staphylococcus aureus FEMS. *Microbiology Reviews*. 2015;39(5):750–763. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv024>
26. Elliott M.R., Koster K.M., Murphy P.S. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol*. 2017;198(4):1387–1394. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601520>
27. Tanno H., Kanno E., Sato S. Contribution of Invariant Natural Killer T Cells to the Clearance of Pseudomonas aeruginosa from Skin Wounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:3931. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22083931>
28. Benoit P., Sigounas V.Y., Thompson J.L. The Role of CD1d-Restricted NKT Cells in the Clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung is dependent on the host genetic background. *Infect. Immun*. 2015;83:2557–2565. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00015-15>
29. Wang H., Feng D., Park O. Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: Opposite regulation by IL-4 and IFN-γ. *Hepatology*. 2013;58:1474–1485. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.26471>