

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ХИРУРГИИ ИМЕНИ А. В. ВИШНЕВСКОГО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Козлова Мария Николаевна

**КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С ОБШИРНЫМИ
ОЖОГАМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИННОВАЦИОННЫХ МЕТОДОВ
ИММУНОКОРРЕКЦИИ**

3.1.9 Хирургия
(медицинские науки)

3.2.7 Аллергология и иммунология
(медицинские науки)

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор
Алексеев Андрей Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор
Земсков Владимир Михайлович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА ОЖГОВОЙ ТРАВМЫ, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОЖГОВОГО СЕПСИСА, ПРИНЦИПЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ	17
1.1. Этиология ожоговой травмы.....	17
1.2. Иммунопатология ожогов и септических осложнений ожоговой болезни.....	18
1.3. Современная стратегия ранней диагностики и прогноза ожогового сепсиса	25
1.4. Роль гемопоэтических стволовых клеток и их субпопуляций в воспалении и регенерации тканей.....	28
1.5. Маркеры для идентификации стволовых клеток в периферической крови	31
1.6. Принципы иммунокоррекции препаратами иммуноглобулинов ...	33
Глава 2. МАТЕРИАЛ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ.....	39
2.1. Дизайн диссертационной работы.....	39
2.2. Методы комплексного лечения пациентов	43
2.2.1. Методы местного консервативного и хирургического лечения пациентов.....	43
2.2.2. Методы иммунокорригирующей терапии.....	45
2.3. Методы исследования иммунного статуса	46
2.4. Методы анализа регенераторного потенциала на этапах хирургического лечения	51
2.5. Методы клинико-лабораторной диагностики сепсиса у обожженных	52
2.7. Статистические методы обработки данных	53

Глава 3. ИММУННЫЙ СТАТУС ПОСТРАДАВШИХ ОТ ОЖОГОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЫ И СТАДИИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ	54
3.1. Иммуный статус пострадавших от ожогов в зависимости от стадии ожоговой болезни и этиологии ожоговой травмы	54
3.2. Иммуный статус пострадавших от ожогов в зависимости от тяжести ожоговой травмы	60
3.3 Клинический пример	64
Глава 4. ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ СЕПТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ	74
4.1. Клиническая характеристика больных с септическими осложнениями ожоговой болезни	74
4.2. Иммуный статус больных с септическими осложнениями ожоговой болезни	75
4.3. Иммуная экспресс-диагностика сепсиса у больных с ожогами	88
Глава 5. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ТЯЖЕЛОБОЖЖЕННЫХ БОЛЬНЫХ НА ЭТАПАХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИММУННОГО СТАТУСА И РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА	93
5.1. Оценка эффективности хирургического лечения пациентов с обширными ожогами на основе исследования иммунного статуса.	93
5.2 Анализ регенераторного потенциала на клеточном и субклеточном уровне у больных с обширными ожогами	105
5.3. Оценка эффективности этапного хирургического лечения у пациентов с обширными ожогами на основе анализа фенотипических маркеров гемопоэтических стволовых клеток	113
5.4. Способ оценки системного регенераторного потенциала у ожоговых больных для определения готовности ожоговых ран к аутодермопластике	118
5.4.1. Клинический пример №1	122
5.4.2. Клинический пример №2	125
Глава 6. КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С ОБШИРНЫМИ ОЖОГАМИ И СЕПТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА «ГАБРИГЛОБИН-IgG» ДЛЯ ИММУНОЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ	130

6.1. Эффективность иммунозаместительной терапии Габриглобином при профилактике сепсиса у больных с обширными ожогами.....	131
6.2. Эффективность иммунозаместительной терапии Габриглобином при лечении сепсиса у больных с обширными ожогами	139
6.3. Клиническая эффективность Габриглобина при профилактике и лечении сепсиса у больных с обширными ожогами	145
Глава 7. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ НА ОСНОВЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО АЛГОРИТМА ИММУНОКОРРЕКЦИИ	149
7.1. Клинический пример	156
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	171
ВЫВОДЫ.....	185
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	187
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	189
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	191

ВВЕДЕНИЕ

Обширные ожоги являются тяжелой травмой, которая, согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно приводит более чем к 180 000 смертей во всем мире [216]. В Российской Федерации ежегодно регистрируется не менее 240 тысяч пациентов с термическими ожогами, при этом госпитализируются около 43-45 тысяч пациентов, в том числе с обширными ожогами, требующие оказания специализированной, высокотехнологичной медицинской помощи [39].

Современное лечение больных с обширными ожогами – это всегда комплексный, последовательный, непрерывный и многоэтапный процесс, направленный на восстановление кожных покровов, профилактику и лечение осложнений [2]. Основой комплексного лечения обширных ожогов является активная хирургическая тактика, направленная на удаление некротизированных тканей и восстановление целостности кожного покрова, с использованием на различных её этапах современных методов местного консервативного и интенсивного общего лечения, что принципиально необходимо для профилактики и успешного лечения гнойно-септических осложнений ожоговой болезни [4, 20, 36, 115].

Однако, несмотря на современные достижения медицины, по-прежнему, основной причиной высокой смертности у тяжелообожженных остаются сепсис и другие инфекционные осложнения [1, 3, 101, 136, 201]. Показатели смертности от сепсиса у взрослых пациентов с ожогами по разным данным составляют 50-84% [39, 75, 121]. Сепсис и другие инфекционные осложнения являются не только основными факторами неудовлетворительных результатов лечения и высокой летальности, но и способствуют более длительному пребыванию пациентов в стационаре, увеличивая экономические затраты на лечение данной категории больных [78, 216]. За последние годы были предприняты огромные усилия по разработке стратегии ранней диагностики и стандартов своевременного лечения сепсиса.

[77, 79, 90, 188]. Согласно новым международным консенсусным положениям по сепсису и септическому шоку (Сепсис-3), сепсис был определен как «опасная для жизни дисфункция органов, вызванная нерегулируемой реакцией хозяина на инфекционное воспаление» [190, 192, 189]. В то же время существует постоянная потребность в пересмотрах и обновлениях определений, руководств и рекомендаций по улучшению диагностики и лечению сепсиса, поскольку показатели выживаемости пациентов существенно не меняются [148]. В настоящее время не существует единого валидированного диагностического теста на сепсис, и идентификация сепсиса основывается на использовании только комбинированных клинических и лабораторных критериев. Кроме того, большинство крупных клинических исследований по сепсису исключили ожоговых пациентов. Это связано с тем, что ожоговая травма изменяет целостность кожи - основного барьера инфекционной инвазии патогенов из окружающей среды [148]. Таким образом, риск развития инфекции и сепсиса у ожоговых пациентов сохраняется до тех пор, пока раны остаются открытыми. Кроме того, у пациентов с обширными ожогами развивается глубокая гиперметаболическая реакция, которая сохраняется в течение длительного времени и при системной воспалительной реакции может вызывать полиорганную дисфункцию [150]. Последующее состояние системного воспаления и вызванной ожогом иммуносупрессии сопровождается еще большей восприимчивостью организма к инвазивной раневой инфекции с развитием сепсиса [99,169].

В данном аспекте современная иммунодиагностика может служить эффективным инструментом в выявлении поврежденных ключевых иммунных маркеров при ожогах, определении степени тяжести нарушений иммунного статуса при ожоговой болезни и риске развития септических осложнений для своевременной иммунокоррекции и обеспечения соответствующей комплексной терапии пациентов с обширными ожогами.

Важным направлением иммунодиагностики у больных с обширными ожогами является также оценка регенераторного потенциала иммунной системы, в том числе на основе анализа циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток.

Известно, что гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) способствуют восстановлению и регенерации тканей через паракринные эффекты или прямую клеточную дифференцировку, являются центральным компонентом восстановления послеожоговой анемии и способны образовывать не только клетки крови, но и другие типы клеток. [46, 47, 50, 55,125]. Причем анализ ГСК при ожоговой травме совершенно не изучен и внедрение новых иммунных маркеров оценки регенераторного потенциала позволит получить объективную информацию о репаративных возможностях организма и готовности больного к выполнению эффективной операции по пластическому закрытию ожоговых ран.

Кроме того, проблема иммунокорригирующей терапии у тяжелообожженных остается чрезвычайно актуальной, дискуссионной и до конца не решенной.

Среди наиболее изученных и широко используемых препаратов с доказанной эффективностью для лечения и профилактики различных иммунодефицитных, аутоиммунных, воспалительных и инфекционных заболеваний наибольший интерес представляют препараты иммуноглобулинов нормальных человеческих для в/в введения (ВВИГ).

В настоящее время ВВИГ включены в международные и национальные рекомендации лечения сепсиса, одобрены FDA для использования не только в качестве заместительной терапии, но и по другим показаниям с противoinфекционной и иммуномодулирующей направленностью [48, 84, 139, 172, 212].

Вместе с тем данные литературы об эффективности иммунозаместительной терапии у больных с ожогами противоречивы. В большинстве исследований не проводилась надлежащая комплексная оценка

иммунного статуса, не разработаны алгоритмы применения препаратов иммуноглобулинов для коррекции иммунного статуса при ожоговой болезни, профилактики и лечения инфекционно-септических осложнений у больных с обширными ожогами. Что определяет актуальность и цель данного исследования.

Цель работы. Улучшение результатов комплексного лечения больных с обширными ожогами на основе разработки и применения инновационных методов ранней иммунодиагностики и персонализированного алгоритма иммунокоррекции для профилактики и лечения гнойно-септических осложнений ожоговой болезни, определения тактики и эффективности хирургического лечения по восстановлению целостности кожного покрова.

Задачи исследования:

1. Изучить иммунный статус на разных этапах комплексного лечения больных с обширными ожогами в зависимости от тяжести ожоговой травмы и стадии ожоговой болезни.
2. Выявить ключевые иммунные маркеры развития гнойно-септических осложнений ожоговой болезни на основе комплексной оценки иммунного статуса у больных с обширными ожогами.
3. Разработать количественную иммунную формулу прогноза и диагностики сепсиса у больных с обширными ожогами.
4. Изучить субпопуляции гемопоэтических стволовых клеток на этапах хирургического лечения больных с обширными ожогами для оценки регенераторного потенциала организма.
5. Оценить эффективность иммунодиагностики у больных с обширными ожогами для определения тактики хирургического лечения по восстановлению целостности кожного покрова на основе анализа иммунного статуса и регенераторного потенциала.
6. Изучить эффективность применения препарата «Габриглобин-IgG», для иммунозаместительной терапии в комплексном лечении больных с обширными ожогами и септическими осложнениями.
7. Оценить эффективность профилактики и лечения осложнений ожоговой болезни на основе персонализированного алгоритма иммунокоррекции.

Научная новизна и практическая значимость работы

1. Впервые получены результаты инновационного исследования иммунного статуса у пациентов с обширными ожогами в зависимости от тяжести ожоговой травмы для определения тактики лечения.
2. Впервые выявлены наиболее информативные иммунные маркеры на основе комплексной оценки иммунного статуса у тяжелообожженных для прогноза и диагностики гнойно-септических осложнений ожоговой болезни.
3. Впервые в мировой практике разработана иммунная количественная формула прогноза и диагностики сепсиса при ожогах.
4. Впервые определены маркеры иммунного статуса и субпопуляций гемопоэтических стволовых клеток у пострадавших от ожогов для оценки адаптационных возможностей, регенераторного потенциала организма и определения оптимальных сроков проведения аутодермопластики.
5. На основе инновационного подхода в иммунодиагностике впервые разработан персонализированный алгоритм иммунокорригирующей терапии с использованием отечественных препаратов иммуноглобулинов для профилактики и лечения сепсиса в комплексном лечении больных с обширными ожогами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При обширных ожогах возникают нарушения иммунного статуса, выраженность которых зависит от тяжести травмы и стадии ожоговой болезни.
2. Иммунная формула (конкретные числовые значения панели информативных иммунных маркеров) дополнительно с клинико-лабораторными данными позволяет прогнозировать и диагностировать развитие сепсиса у обожженных.

3. Комплексное лечение больных с обширными глубокими ожогами на основе активной хирургической тактики, направленной на своевременное удаление нежизнеспособных тканей и восстановление целостности кожного покрова позволяет уменьшить эндогенную интоксикацию и гиперактивацию иммунной системы, купировать иммунодефицит клеточного и гуморального иммунных звеньев с восстановлением регенераторного потенциала на клеточном и субклеточном уровне без применения иммунокорригирующей терапии.
4. Персонализированные методы диагностики иммунного статуса и регенераторного потенциала у больных с обширными ожогами позволяют определить тактику хирургического лечения для эффективного восстановления кожного покрова и своевременно использовать иммунокоррекцию.
5. Персонализированный алгоритм иммунокоррекции на основе комплексного анализа иммунного статуса позволяет эффективно использовать препараты иммуноглобулинов для профилактики и лечения сепсиса у больных с обширными ожогами.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.1.9 – хирургия («медицинские науки»), конкретно пунктам: 1. «Изучение причин, механизмов развития и распространенности хирургических заболеваний», 2. «Разработка и усовершенствование методов диагностики и предупреждения хирургических заболеваний» и паспорту научной специальности 3.2.7 – аллергология и иммунология («медицинские науки»), конкретно пунктам 6. «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов», 7. «Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических

препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий».

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в качестве соисполнителя в выполнении различных научно-исследовательских разработок (НИР) Государственного задания в комбустиологии, результаты которых представлены в диссертационной работе (табл. 1).

Таблица 1. Тематика научно-исследовательских разработок (НИР) Государственного задания, результаты которых включены в диссертационную работу

№	Наименование тематики научно-исследовательских разработок	Период выполнения НИР (год начала, год окончания)	Степень участия
1.	Изучение клеточно-молекулярных механизмов адаптации к тяжелой ожоговой травме	2012 - 2014	Ответственный исполнитель по фрагменту «клиническая иммунология»
2.	Разработка инновационных методов лечения ран, ожогов и патологических рубцов с использованием инвазивных технологий, технологий и продуктов регенеративной медицины	2015 - 2017	Ответственный исполнитель по фрагменту «клиническая иммунология»
3.	Технология комплексного лечения пострадавших от ожогов с использованием биотехнологических методов восстановления кожных покровов, диагностики и интенсивной терапии осложнений ожоговой болезни, профилактики и хирургического лечения последствий ожоговой травмы	2018-2020	Ответственный исполнитель по фрагменту «клиническая иммунология»
4.	Разработка, совершенствование и внедрение инновационных методов диагностики, интенсивного общего и местного лечения для повышения эффективности и качества оказания специализированной, высокотехнологичной медицинской помощи пострадавшим от ожогов	2021-2023	Исполнитель

Автор лично разработал дизайн работы и провел отбор пациентов в исследование, лично проводил лабораторные иммунологические анализы, участвуя как в пробоподготовке, так и в выполнении всех представленных в работе методов иммунодиагностики с выдачей заключений по иммунному статусу пациентов.

Автор лично консультировал пациентов в качестве клинического иммунолога с назначением и оценкой эффективности иммунокорригирующей терапии на всех этапах комплексного лечения, также участвовал в консилиумах по сложным случаям иммунопатологии, гнойно-септических осложнений и результатам хирургического лечения больных с обширными ожогами. Автором самостоятельно выполнен сбор данных, их статистическая обработка и анализ полученных результатов, а также сформулированы выводы и разработаны практические рекомендации, проистекающие из результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационного исследования представлены автором в виде научных статей, тезисов докладов, практического руководства, устных и постерных докладов на ведущих Российских форумах, конференциях и конгрессах с международным участием.

Внедрение результатов работы

Основные результаты научно-исследовательской работы внедрены в клиническую практику Ожогового центра ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России и в педагогическую практику образовательного отдела ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава РФ.

Степень достоверности результатов диссертационной работы

О достоверности результатов свидетельствует достаточная выборка больных (275 пациентов), широкий спектр и большое количество клинико-лабораторных и иммунологических исследований (более 33975). При проведении исследований использовано сертифицированное современное оборудование. Используются различные современные статистические методы и оценочные шкалы. Методами статистической обработки установлена воспроизводимость и достоверность результатов исследования.

Автор лично участвовал в выполнении и разработке исследований, получении и анализе исходных данных.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационного исследования неоднократно доложены и обсуждены на Российских конференциях и съездах с международным участием по проблемам хирургии, комбустиологии, иммунологии и аллергологии, клинической лабораторной диагностики.

Доклады представлены на:

- 1) III Съезд комбустиологов России (г. Москва, 2010).
- 2) VI Всемирный конгресс по иммунопатологии и респираторной аллергии. VIII Съезд аллергологов и иммунологов СНГ и V Съезд иммунологов России (г. Москва, 2011).
- 3) Международная конференция «Термические поражения и их последствия». V Съезд комбустиологов России (г. Москва, 2017).
- 4) Научно-практическая конференция «Профилактика, диагностика и лечение гнойно-септических осложнений в многопрофильном стационаре» (г. Москва, 2018).
- 5) Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы комбустиологии» (г. Сочи, 2019).

- 6) V Научно-практическая конференция «Аллергология и иммунология для практикующих врачей» (г. Сочи, 2019).
- 7) Всероссийский конгресс с международным участием по фундаментальным проблемам лабораторной диагностики «Академия лабораторной медицины: новейшие достижения» (г. Москва, 2021).
- 8) Форум комбустиологов России с международным участием (г. Суздаль, 2021).
- 9) VIII Российский конгресс лабораторной медицины (г. Москва, 2022).
- 10) Всероссийский симпозиум с международным участием «Трудный пациент в комбустиологии: вопросы интенсивного лечения» (г. Москва, 2022).
- 11) IX Российский конгресс лабораторной медицины (г. Москва, 2023).
- 12) Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Ожоги: диагностика, лечение, реабилитация» (г. Махачкала, 2023).
- 13) Международный форум «Армия 2023». Алабино. 2023.
- 14) Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Ожоги у детей и взрослых» (г. Екатеринбург, 2024).
- 15) VI Национальный конгресс по регенеративной медицине с международным участием (г. Санкт-Петербург, 2024).
- 16) VII Съезд комбустиологов России с международным участием (г. Москва, 2025).
- 17) Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы хирургии и комбустиологии» (Узбекистан, г. Андижан, 2025).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано – 25 научных работ общим объемом – 152 п.л., из них 14 статей в журналах Перечня ВАК, 2 статьи в издании индексируемых в международной базе Scopus, 9 статей в зарубежной печати.

Поданы 2 заявки на изобретения, получены положительные решения.

Иные публикации – 30 в сборниках материалов Российских научных конференций с международным участием, а также главы в практическом руководстве под ред. А.Ш. Ревитшвили. В.М. Земсков. А.М. Земсков. «Оптимизация диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний (инновационные технологии)». Санкт-Петербург: Издат. «Спец Литература». 2020. 319с.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 214 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы по описанию материалов, методов исследования и лечения, пяти глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. В списке литературы приведены наименования 226 источников, из которых 47 отечественных и 179 зарубежных авторов. Диссертация содержит 20 таблиц, иллюстрирована 78 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА ОЖГОВОЙ ТРАВМЫ, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОЖГОВОГО СЕПСИСА, ПРИНЦИПЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

1.1. Этиология ожоговой травмы

Обширные ожоги являются одними из наиболее тяжелых и распространенных травматических повреждений, связанных с высокой частотой развития осложнений и неблагоприятных исходов. Смертность от ожогов во всем мире колеблется от 2,3% до 3,6%. При этом 85-90% составляют люди трудоспособного возраста [216]. В Российской Федерации ежегодно около 45000 пациентов нуждаются в длительной специализированной, высокотехнологичной медицинской помощи с существенными экономическими затратами на лечение и реабилитацию [39]. Большинство случаев ожоговых травм происходят в повседневной жизни, в тоже время очевидно увеличение пострадавших с тяжелыми и крайне тяжелыми ожогами, связанных с массовыми поражениями в результате военных действий, техногенных катастроф и пожаров в общественных местах. Опыт лечения этих больных показал, что ожоговая болезнь у них протекает более тяжело, чем у пострадавших в бытовых условиях [3, 36].

Успешное лечение больных с обширными и глубокими ожогами возможно только при своевременной, адекватной тяжести травмы и состояния больного, комплексной терапии ожоговой болезни на всем ее протяжении, где основой является активная хирургическая тактика, направленная на удаление некротизированных тканей и восстановление целостности кожного покрова [2, 4, 20, 36, 115].

Существует несколько типов ожоговых повреждений: химические (кислотные и щелочные), электрические и термические, которые являются наиболее распространенными. При длительном и обширном тепловом повреждении ожоги могут быть обширными и вызывать системные

патологические реакции у пациентов. При поверхностных ожогах более 15 % от общей площади поверхности тела и глубоких ожогах более 10% поверхности тела, как правило, развивается ожоговая болезнь [36, 162, 225].

Ожоговая болезнь – это целый комплекс взаимосвязанных патофизиологических реакций и клинических проявлений в ответ на термическую травму. Ожоговая болезнь в своем течении последовательно проходит 4 периода: ожоговый шок, острая ожоговая токсемия, септикотоксемия, реконвалесценция. Стресс и многочисленные патогенетические факторы, связанные с наличием ожоговой раны, приводят к нервно-рефлекторным, нейроэндокринным и воспалительным системным реакциям у обожженных с нарушением саморегулирующихся систем организма и иммунного статуса различной степени выраженности [36].

1.2. Иммунопатология ожогов и септических осложнений ожоговой болезни

В Институте хирургии им. А.В. Вишневского с 1947 г. начались первые научные исследования по изучению проблемы ожогов, разработка и совершенствование методов лечения обожженных больных с привлечением физиологов, морфологов, биохимиков и других специалистов. Научно-практические результаты этой многолетней работы отражены в известной монографии Г.Д. Вилявина и О.В. Шумовой «Патогенез и лечение ожоговой болезни», 1963 г. [12].

С 70-х гг. прошлого столетия на базе Всесоюзного ожогового центра Института хирургии им. А.В. Вишневского проводились одни из первых отечественных работ по изучению иммунологических механизмов и реакций у ожоговых больных.

По определению И.И. Колкера ожоговая болезнь рассматривалась, прежде всего, как заболевание с «вторичной» (приобретенной) иммунной недостаточностью, при котором особенно подавлены клеточные механизмы защиты» [31]. Так, у обожженных выявлены морфологические и структурные

нарушения периферических макрофагов и нейтрофилов, сопровождающиеся нарушением их защитных функций [30, 8, 7, 24], подавление гиперчувствительности замедленного типа [40] и кислородного метаболизма фагоцитов [1, 32]. Было показано, что ожоговая травма вызывала абсолютный Т-клеточный дефицит и относительный дефицит гуморального иммунитета и факторов неспецифической резистентности организма у пострадавших с глубокими ожогами с различной площадью поражения [1, 32, 35]. Впоследствии были выделены адаптивные и дезадаптивные реакции у пострадавших с обширными ожогами на основе результатов цитокинового статуса и митохондриальной индукции апоптоза, продемонстрировано угнетение иммунного ответа по Т-хелперному 1 типу и преждевременное формирование ответа по Т-хелперному ответу 2 типа [5,42].

Другие исследователи, также указывали на разнонаправленные изменения фактически всех звеньев иммунной системы у тяжелообожженных. По данным Пивоваровой Л.П. и соавторов иммунный анализ крови 35 пострадавших с тяжелой термической травмой выявил у всех пациентов уже в момент поступления в ожоговый центр снижение содержания лимфоцитов за счёт зрелых Т-лимфоцитов. Причём более всего снижалось число лимфоцитов с экспрессией рецепторов ИЛ-2, основное число лимфоцитов с экспрессией HLA-антигенов I и II классов в общем не менялось, хотя нарастало содержание клеток с экспрессией адгезионных молекул и кислородный метаболизм фагоцитов. Эти изменения нарастали к 3-им суткам после ожоговой травмы с развитием дефицита В-лимфоцитов и повышением содержания иммуноглобулина А в сыворотке крови, тогда как уровень иммуноглобулинов G и M существенно не менялся. [38].

Результаты оценки параметров клеточного иммунитета у 50 взрослых пациентов с ожоговой травмой, поступивших на лечение во ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России и НИИ СП им. И.И. Джанелидзе свидетельствовали также о дисбалансе активационной и супрессорной

активности иммунной системы. Выявлено значительное повышение относительного количества, во-первых, Т-лимфоцитов на фоне снижения В- и NK-клеток, во-вторых — активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR антиген, в-третьих, Т-регуляторных лимфоцитов, свидетельствующих о неконтролируемом системном воспалении в результате ожоговой травмы, что особенно выражено у пациентов с летальным исходом [10].

Патогенетические механизмы развития осложнений при тяжелых ожогах крайне сложны и многогранны, включают молекулярно-клеточные взаимодействия и реакции самых разных органов и систем. Разумеется, что без правильного представления об этиологии и патогенезе ожоговой болезни нельзя осуществить раннюю надежную диагностику и лечение ее самого грозного осложнения - сепсиса.

Одним из основных патогенетических факторов развития инфекционных осложнений и сепсиса является вторичное иммунодефицитное состояние, характерное для ожоговой болезни (Колкер И.И., 1980; Пивоварова Л.П., 2000; Алексеев А.А., 2010; Крутиков М.Г., 2010; Boomer J.S. [et al.], 2011). В то же время, у пациентов с обширными и глубокими ожогами выраженная реакция системного воспаления и иммуносупрессия различных звеньев иммунитета способствуют развитию инвазивной раневой инфекции с высоким риском септических осложнений (Boomer J.S., 2011; Hotchkiss R.S., 2013; Zemskov V.M., Alekseev A.A., 2016). При этом эндогенная интоксикация организма продуктами распада тканевых белков, аутоантигенов, микробных компонентов и токсинов также негативно сказывается на общем состоянии организма пациента, замедляя процесс выздоровления и сроки заживления ожоговых ран [80, 104, 138, 171].

Кроме того, у пациентов с обширными ожогами развивается глубокая гиперметаболическая реакция, которая сохраняется в течение месяцев и при системной воспалительной реакции может вызывать полиорганную

дисфункцию [52, 150, 177]. Последующее состояние системного воспаления и вызванной ожогом иммуносупрессии сопровождается еще большей восприимчивостью организма к развитию инвазивной раневой инфекции и сепсиса [148, 169, 99]. В связи с этим можно предположить, что при массовых катастрофах, приводящих часто к многофакторным поражениям и сопровождающихся максимальной напряженностью психоэмоциональной сферы пострадавших, иммуносупрессия должна быть существенно более выраженной.

Повреждение тканей после ожога «запускает» защитные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета с вовлечением биологических медиаторов воспаления, цитокинов и факторов роста, элементов внеклеточного матрикса, а также различных клеток иммунной системы (Litman G.W., 2010; Ebert G., 2016; Auger C., 2017). Известно, что одной из основных причин развития инфекции и инфекционных осложнений у обожженных является глубокая супрессия гуморального и клеточного иммунитета [30, 32, 60, 159, 186]. Вместе с тем свой вклад в развитие фатальных осложнений может вносить и гиперактивация иммунной системы, поддерживающая системное воспаление и усугубляющая иммунодефицит клеточно-гуморальных факторов иммунной системы [111, 219, 153].

По мнению В.А. Pruitt (1982) серьезные инфекции мягких тканей чаще всего развиваются вследствие травмы, являются клиническим проявлением дисбаланса между иммунными механизмами и микробными факторами, что особенно выражено при тяжелой ожоговой травме [179]. Благоприятный исход раневого процесса во многом зависит от состояния иммунной системы больного [14, 43].

Вместе с тем, сепсис оказывает глубокое влияние на иммунную систему. В прошлом сепсис иммунологически описывался как двухэтапный последовательный процесс. Первоначальный провоспалительный ответ, где преобладают врожденные механизмы иммунного ответа, приводил к синдрому системного воспалительного ответа (SIRS) с последовательным

развитием синдрома компенсаторного противовоспалительного ответа (CARS) с нарушением адаптивного иммунного ответа и переходом в иммуносупрессивное состояние, что способствовало утяжелению инфекционного процесса и полиорганной недостаточности [63, 110, 123, 161].

Многоцентровое исследование, в котором оценивали экспрессию генов у пациентов с сепсисом, поставило под сомнение двухфазность провоспалительного и противовоспалительного процесса при сепсисе. Это исследование продемонстрировало одновременную активацию как про-, так и противовоспалительных генов, что было описано как «геномный шторм» и нередко преобладание гиперовоспалительного ответа способствовало развитию синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) [219].

Другая группа исследователей согласилась с одновременной про- и противовоспалительной реакцией организма при сепсисе, но отметили, что существуют исследования, где доминантная иммуносупрессия связана с развитием органной дисфункции [64, 111, 137, 119].

Группа ученых из Университета Флориды назвала хроническое состояние, которое сохраняется при длительном сепсисе, как «синдром стойкого воспаления-иммуносупрессии и катаболизма (PICS)» [153]. Этот термин соответствует истощению и «повторному» сепсису и вероятно, не имеет значения, являются ли поздние последствия сепсиса провоспалительным процессом или иммуносупрессией. Можно предположить, что оба пути способствуют развитию септических осложнений [154].

На современном этапе представлений о патогенезе сепсиса, совершенно очевидно, что одна из ключевых ролей принадлежит иммунным нарушениям.

В первую очередь при любом повреждении тканей, в том числе при ожоговой травме, задействуются механизмы врожденного иммунитета, включающего, в том числе рецепторы распознавания патогенных

микроорганизмов на фагоцитарных клетках, и адаптивного иммунитета, состоящего из системы лимфоидных клеток и антител [86, 93, 143, 151].

Известно, что индукторами или сигналами инициации воспалительного ответа являются молекулы, высвобождаемые из бактерий и вирусов (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны - PAMP) или из поврежденных клеток (молекулярные паттерны, связанные с повреждением - DAMP). Классическими PAMP являются липополисахарид из клеточных стенок грамотрицательных бактерий, вирусная ДНК или РНК и др. При повреждении клеток, в том числе при ожоговой травме, высвобождаются митохондрии, белки теплового шока и другие модифицированные белковые молекулы, относящиеся к DAMP, которые также инициируют воспалительный ответ. К клеточным рецепторам распознавания относятся также Toll-подобные рецепторы, которые являются важным компонентом клеток врожденной иммунной системы (моноциты, незрелые дендритные клетки и др.). Когда индукторы связываются с рецептором, внутриклеточная сигнализация инициируется множеством путей, ведущих к экспрессии генов, чтобы продуцировать медиаторы, которые используются для клеточной сигнализации между клетками иммунной системы [133, 226, 180].

Классическими медиаторами являются провоспалительные цитокины, в основном такие, как фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1) и интерлейкин-6 (IL-6), на высвобождение которых реагируют клетки, ткани и органы. Как только ожоговое повреждение достигает определенного порогового уровня, 15% и более общей площади тела, массивный пул («шторм») цитокинов может попадать в системную циркуляцию, а гипофиз сигнализирует о высвобождении катехоламинов и глюкокортикоидов из надпочечников, что вызывает гипертермию, тахикардию, тахипноэ и увеличение скорости обмена веществ и метаболизма в целом. Термином для этого общего состояния организма как раз является синдром системного воспалительного ответа (SIRS) [88, 114]. Кроме того, цитокины инициируют капиллярную утечку, в том числе за счет взаимодействия с

внутрипросветными рецепторами на эндотелиальных клетках капиллярных сосудов [132, 176].

Наблюдается переход в состояние прокоагуляции, что наряду с повреждением капилляров усиливает адгезию тромбоцитов и потребление факторов коагуляции. Существенно, что одним из самых ранних признаков сепсиса является снижение количества тромбоцитов, а потребление факторов свертывания крови и тромбоцитов может вызвать диссеминированную внутрисосудистую коагулопатию - ДВС-синдром [122].

В ответ на гипоксию клетки вырабатывают оксид азота (NO), что способствует общему снижению системного сосудистого сопротивления, которое обычно наблюдается при сепсисе. В печени происходит усиление синтеза белков острой фазы с возрастанием содержания С-реактивного белка. Недостаточная перфузия в конечном итоге сказывается на работе органов, повышается уровень молочной кислоты - лактата, который оказывается еще одним из ранних признаков сепсиса. Если в почечных канальцах наблюдается слабый кровоток в связи с токсическими молекулами, у пациента развивается острая почечная недостаточность с нарастанием креатинина и мочевины крови. Подобное повреждение печени вызовет увеличение сывороточных печеночных ферментов и билирубина. [82].

Таким образом, синдром полиорганной недостаточности является прямым ответом на иммунные нарушения при сепсисе. В то же время системная воспалительная реакция, вызванная ожогами, может имитировать проявление сепсиса и усложнять его раннюю диагностику.

В этой связи актуальным становится разработка ранних надежных диагностических и прогностических критериев риска развития сепсиса и инфекционных осложнений еще до начала развития полиорганных нарушений для проведения своевременной комплексной терапии на этапах хирургического лечения тяжелообожженных больных.

1.3. Современная стратегия ранней диагностики и прогноза ожогового сепсиса

Своевременная диагностика и незамедлительное лечение ожогового сепсиса являются ключевыми элементами для увеличения шансов на благоприятные исходы в популяции, подверженной риску инфекционных осложнений [92, 124, 145].

Большой международной группой ученых и клиницистов в рамках международной кампании «Выживание при сепсисе» была разработана обновленная стратегия раннего лечения всех аспектов сепсиса и показано, что чем раньше происходит выявление и лечение сепсиса, тем отмечаются лучше результаты [90].

Известно, что у всех пациентов с ожогами более 20% поверхности тела будут наблюдаться постоянные эпизоды системной воспалительной реакции, которые могут сохраняться в течение времени, пока ожоговые раны не будут полностью закрыты [100].

Кроме того, пациентам с ожогами обычно требуются долгосрочные инвазивные процедуры, центральные и мочевые катетеры, интубация трахеи и др. До тех пор, пока присутствуют эти инвазивные устройства, риски развития нозокомиальной пневмонии, связанной с ИВЛ, инфекции мочевыводящих путей существенно возрастают, чаще происходит колонизация множественными устойчивыми микроорганизмами, в том числе возбудителями грибковых и вирусных инфекций. Эти пациенты нуждаются в постоянном мониторинге клинико-лабораторных параметров, отражающих тяжесть полиорганных нарушений и маркеров воспалительно-инфекционного процесса. При этом необходима объективная оценка изменений со стороны ожоговых ран, уровня сознания и гипертермии, потребности в жидкости и респираторной поддержке и т.д. [49, 53, 54, 101, 116, 118, 211, 135].

Клинически трудно идентифицировать пациентов, у которых развивается сепсис, поскольку подавляющая системная воспалительная

реакция, вызванная ожоговой травмой, имитирует клинико-лабораторные признаки и симптомы сепсиса [101, 167, 220].

Для решения этой проблемы в нашей стране в Институте хирургии им. А. В. Вишневского в 90-х годах прошлого столетия впервые разрабатывались критерии диагностики ожогового сепсиса на основе комплексной оценки состояния больного, включая и исследования иммунного статуса пациента (Алексеев А.А., 1993). В первую очередь учитывались клинические признаки прогрессирующего ухудшения общего состояния больного (постоянная лихорадка с ознобами, нарушение гемодинамики, развитие почечной и печеночной недостаточности), несоответствие стадии развития заболевания и характера течения раневого процесса с появлением вторичных некрозов, атрофичных грануляций ожоговых ран, несмотря на активное лечение. Из лабораторных изменений учитывались стойкая, не поддающаяся коррекции анемия, лимфопения, увеличение СОЭ, высокая бактериальная обсемененность ожоговых ран, в том числе в составе ассоциации микроорганизмов, бактериемия в динамике, признаки иммуносупрессии фагоцитоза, клеточного и гуморального иммунитета, дисбаланс спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов [1].

Американская ассоциация по ожогам (ABA) в 2007 году для стандартизации определения сепсиса у ожоговых больных включила диагностические критерии в основном клинических симптомов SIRS: гипер- или гипотермия, прогрессирующая тахикардия и прогрессирующее тахипноэ. Задokumentированная инфекция определена как культурально-положительная инфекция или установлен источник патологической ткани, или клинический ответ на противомикробные препараты. Из лабораторных показателей принимаются во внимание лишь тромбоцитопения и гипергликемия и не один из иммунных маркеров не был включен в диагностику сепсиса [100, 107, 149, 168].

Поиски «септических» маркеров у ожоговых больных интенсивно продолжаются на протяжении многих десятков лет. При этом

взаимодействие различных иммунных биомаркеров друг с другом и влияние их количественных и функциональных изменений на результаты лечения, все еще мало изучено.

В литературе описаны многочисленные маркеры сепсиса, которые в основном представляют собой мономаркеры септического процесса [51, 67, 83, 105, 144, 152, 183]. По всей видимости, данный подход не является оптимальным. В настоящее время рядом исследователей активно разрабатываются иммунные методы диагностики и прогноза генерализации и септических осложнений на основе панелей биомаркеров.

Так, N.I. Shapiro с соавторами отказались от использования только одного биомаркера для диагностики и прогноза сепсиса. В проспективном многоцентровом исследовании на 971 пациенте исследователями был проведен анализ панели биомаркеров для прогнозирования органной дисфункции, шока и госпитальной смертности у пациентов с подозрением на сепсис. Среди девяти протестированных биомаркеров, в которую вошли D-димер, МИФ, протеин С, СРП, растворимый рецептор ИЛ-1 β -Р, желатиназный липокалин нейтрофилов, ФНО, пептидогликан-узнающий протеин, мозговой натрийуретический пептид. Существенно, что оптимальной 3-х маркерной панелью оказались липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов, протеин-С и антагонист рецептора интерлейкина-1. По данным авторов, с помощью совокупного анализа данных маркеров можно было прогнозировать развитие тяжелого сепсиса и летальности за 72 часа [191].

Также считают и другие исследователи, которые использовали панели иммунных маркеров для прогнозирования септических осложнений в отличие от манипулирования только каким-либо одним параметром [13, 21, 65, 89, 106, 131].

Иммунная система организма является именно той системой, которая предохраняет и защищает организм главным образом от инфекционных заболеваний. Поэтому, именно разработка стратегии ранней

иммунодиагностики и прогноза сепсиса, где в основу должны быть включены количественные иммунные маркеры, отражающие механизмы патогенеза про- и противовоспалительного ответа, и вовлечения всех звеньев иммунной системы (клеточного, гуморального, фагоцитарного и др.) при сепсисе, позволит предотвратить его развитие и улучшить результаты лечения у больных с тяжелой ожоговой травмой. В этой связи своевременная диагностика развития инфекционно-септических осложнений на основе мониторинга иммунных маркеров является одной из актуальных задач проводимого комплексного, в том числе хирургического, лечения больных с обширными ожогами. Одним из ключевых направлений комплексного лечения тяжелообожженных является внедрение и широкое применение современных методов иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии [18, 27].

1.4. Роль гемопоэтических стволовых клеток и их субпопуляций в воспалении и регенерации тканей

Одним из важных направлений в комплексном лечении больных с обширными ожогами является оценка тканевой регенерации для определения готовности грануляционной ткани ожоговых ран к аутодермопластике, выбора тактики и оптимальных сроков хирургического лечения по восстановлению целостности кожного покрова, улучшения функциональных и эстетических результатов лечения тяжелообожженных.

Восстановление и регенерация поврежденных тканей, как правило, сопровождаются скоординированным взаимодействием между несколькими типами клеток, включая как локальные тканеспецифичные стволовые клетки-предшественники, мезенхимальные стромальные клетки и иммунные клетки, так и предположительна роль гемопоэтических стволовых клеток, мобилизованных из костного мозга, которые достигают восстанавливающихся тканей через циркуляторное русло [68, 72, 76, 81, 142, 164, 178, 221].

Стволовая клетка – комплексное название большого количества видов недифференцированных клеток, объединенных свойствами к самообновлению, дифференцировке и самоподдержанию, но различных по дифференцирующему потенциалу или потентности [6, 47].

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) - самообновляющиеся, мультипотентные клетки костного мозга, которые отвечают за пополнение всех клеточных компонентов крови, в том числе лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Они - центральный компонент восстановления послеожоговой анемии. Клинически и экспериментально ГСК показали способность к мобилизации из костного мозга в кровотоки после различных травм, в том числе инфаркта миокарда, инсульта, поражения печени, костей и почек, ожогов кожи. Предполагается участие ГСК в восстановлении и регенерации тканей через паракринные эффекты или прямую дифференцировку [44, 46, 50, 55, 125, 126, 128, 195, 203].

Исследования последних лет показали, что гемопоэтические стволовые клетки не однородная гомогенная популяция, одинаковая по своим свойствам, клеток, а это сложная, гетерогенная смесь субпопуляций ГСК, обладающих различными кластерами дифференцировки разной степени зрелости, временем жизни, краткосрочной и долгосрочной регенеративной активностью [71, 85, 158, 185].

Роль ГСК в гомеостазе при развитии инфекции – это новая область научных исследований. Инфекция является естественным стрессовым фактором для кроветворной системы и клетки иммунной системы расходятся в борьбе с вторгшимися патогенами либо путём мобилизации к очагам инфекции, либо путём апоптоза [109]. Поддержание гомеостаза в системе кроветворения зависит от замещения иммунных эффекторных клеток предшественниками кроветворения. Например, общие миелоидные предшественники в костном мозге и периферической крови могут быстро вырабатывать большое количество нейтрофилов в ответ на развитие сепсиса [202].

Недавно было показано, что гемопоэтические стволовые клетки немедленно реагируют на инфекцию и что провоспалительные цитокины крайне важны для регуляции гемопоэтических стволовых клеток. Как известно, каноническое воздействие на эффекторные клетки иммунной системы проявляется в активации провоспалительными цитокинами (фактор некроза опухоли α , интерлейкин-1 и интерлейкин-8 - дендритных клеток, макрофагов и нейтрофилов, а интерлейкин-2 и интерфероны α , β , γ - для Т-клеток и естественных киллеров, в то время как интерлейкин-4 и интерлейкин-6 активируют В-клетки). Однако, эти же цитокины необходимы для поддержания количества, пролиферации и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток, как в условиях нормального гомеостаза, так и в ответ на стресс [113, 127, 141, 160, 199].

Кроме того, нарушение регуляции провоспалительных цитокинов при длительном воспалении и последующее их воздействие на самые ранние гемопоэтические предшественники могут быть основными причинами гематологических нарушений и синдрома недостаточности костного мозга. Так, устойчивая активация IFN- α/γ во время хронической инфекции ухудшает функцию ГСК и в конечном итоге может привести к истощению костного мозга [56, 209]. Хроническая передача сигналов TNF- α связана с миелодиспластическим синдромом и недостаточностью костного мозга [129]. Интерлейкин-1 непосредственно активирует пролиферацию и дифференцирует ГСК, что при чрезмерной его активности вызывает снижение потенциала самообновления ГСК [174]. Поэтому крайне важно, своевременное купирование воспалительных реакций с целью сохранения нормальной регуляции кроветворения и иммунной системы в целом.

1.5. Маркеры для идентификации стволовых клеток в периферической крови

В периферической крови ГСК выделяют из общей массы на основе экспрессии определенных антигенов на поверхности клетки с использованием моноклональных антител против панлейкоцитарного антигена CD45 и маркера ранних клеток-предшественников CD34.

ГСК относительно редки, их содержание в костном мозге колеблется около 0,01-0,15% от всех ядерных клеток. В периферической крови здоровых людей ГСК CD45⁺34⁺ циркулируют в очень небольших количествах, около 0,5-5,0 клеток/мл [47].

Антиген CD34 - является общепризнанным маркером для обнаружения стволовых клеток крови человека и представляет собой мембранный белок, молекулу межклеточной адгезии, играющую роль на ранних этапах кроветворения [66, 170]. Несмотря на достаточно четко определенную структуру белка и его использование при идентификации гемопоэтических стволовых клеток, фактическое значение клеточной функции антигена CD34 до конца не известно. Предполагается участие белка CD34 в мобилизации и пролиферации гемопоэтических клеток-предшественников, а также в адгезии лимфоцитов к эндотелию сосудов с помощью связывания с L-селектином [134]. В кроветворной ткани существуют пути взаимного превращения CD34⁻ клеток в CD34⁺. При этом обе фракции могут поступать как в периферическую кровь из костного мозга, так и мигрировать обратно [197].

Для анализа ГСК используют также антитела против активационного антигена CD38, в том числе в комбинации с комплексными антителами к фенотипам. CD38 - мультифункциональный мембранный поверхностный гликопротеин, который экспрессируется различными клетками на определенных этапах их развития. Кроме того, определена его роль в процессе адгезии лимфоцитов к эндотелию сосудов. В качестве трансмембранного рецептора CD38 может передавать как положительные, так и отрицательные сигналы, регулирующие пролиферацию и

дифференцировку Т- и В –лимфоцитов. Внеклеточная часть молекулы CD38 функционирует как фермент, который катализирует синтез и гидролиз циклической АДФ-рибозы, которая недавно была идентифицирована как мощный Ca^{2+} мобилизирующий агент. Ферментные функции CD38, вероятно, имеют иммунорегуляторное значение. Молодые стволовые кроветворные клетки человека не имеют кластера дифференцировки CD38, в то время как зрелые клеточные формы его уже содержат. В качестве основного фенотипа ГСК человека рассматривается комбинация из моноклональных антител $\text{CD45}^{\text{dim}}\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ [166, 210, 218].

Помимо «классических» маркеров ГСК в последние годы возрастает интерес к исследованию новых антигенов. На поверхности ГСК человека установлено наличие нового кластера дифференцировки CD133, который также экспрессируется на разных типах клеток (эндотелиальных, нейронных и глиальных стволовых клетках, различных опухолях головного мозга у детей, а также в почках, молочных железах, трахеи, слюнных железах, плаценте, пищеварительном тракте, яичках и др.) и не определяется на поздних прогениторных кроветворных клетках [96, 173].

Вместе с тем, многие исследования подтверждают участие фиброцитов в поствоспалительной фазе заживления различных тканей, в том числе печени, лёгких и кожи [102, 120, 196, 217]. Считается, что фиброциты — это клетки гемопоэтического происхождения, которые дифференцируются в мезенхимальные клетки по мере миграции в места повреждения, им приписывают множество функций в процессе долгосрочного восстановления тканей, таких как гипертрофический рубец [59, 61, 175, 73, 157]. Однако, другие исследования не выявили долгосрочного вклада клеток костного мозга в заживление ран [181, 182, 194].

Таким образом, роль гемопоэтических стволовых клеток при заживлении обожженных тканей остается малоизученной и дискуссионной.

1.6. Принципы иммунокоррекции препаратами иммуноглобулинов

Проблема иммунокорригирующей терапии у тяжелообожженных остается чрезвычайно актуальной и до конца не решенной.

Среди наиболее изученных и широко используемых препаратов с доказанной эффективностью для лечения и профилактики различных иммунодефицитных, воспалительных, инфекционных и аутоиммунных заболеваний наибольший интерес представляют препараты иммуноглобулинов нормальных человеческих для внутривенного введения.

Иммуноглобулины являются важнейшими факторами гуморального иммунного ответа. Структурно все иммуноглобулины состоят из 2-х идентичных легких и 2-х идентичных тяжелых цепей. В молекуле иммуноглобулина выделяют 2 фрагмента: Fab и Fc, определяющие различные свойства иммуноглобулинов. Fab фрагмент обладает антигенсвязывающей способностью, для которой установлена большая вариабельность аминокислотных последовательностей, чем и объясняется большое разнообразие иммуноглобулинов с различной антигенной специфичностью. Fab фрагмент способствует агглютинации клеточных антигенов, развитию преципитации молекулярных антигенов и активации комплемента альтернативным путем. Fc фрагмент, не обладая антигенсвязывающими свойствами, определяет специфичные свойства для различных классов иммуноглобулинов, преимущественно за счет связывания с соответствующими рецепторами на различных клетках. Например, для иммуноглобулина G определяет участие в регуляции антителозависимой цитотоксичности, специфической активации комплемента, в трансплацентарном переносе и др. [34, 184, 213].

В процессе иммунного ответа ранее других начинают секретироваться иммуноглобулины М - антитела экстренной иммунной защиты, предохраняя организм от бактериемии и обладающие высокой способностью связывать комплемент, агглютинировать и лизировать клетки мишени, нейтрализовать

экзотоксины. Однако им свойственно относительно низкое сродство к антигену, и оно не возрастает в процессе иммунного ответа, что ограничивает их биологическую активность [62].

Иммуноглобулины G составляют основную часть антител крови человека - около 80 % от общего уровня иммуноглобулинов. Иммуноглобулины G обладают высоким сродством к антигену и выполняют различные эффекторные и регуляторные функции, обеспечивая защиту организма от микроорганизмов и их токсинов. Иммуноглобулин A секретируется в слизистых оболочках и выполняет функцию их специфической локальной защиты. Иммуноглобулин E является главным фактором аллергической реакции гиперчувствительности немедленного типа, что связано с его родством к рецепторам тучных клеток, он же имеет важное значение в противопаразитарной защите. Функция сывороточного Иммуноглобулина D в настоящее время до конца не ясна, известна его роль в качестве мембранного иммуноглобулина. Таким образом, именно Иммуноглобулины G и M в основном определяют противоинфекционную защиту организма. Иммуноглобулины M — основной фактор нейтрализации экзотоксинов. Иммуноглобулины G — основной фактор борьбы с внутриклеточными патогенами: опсонизируя клетки, эти антитела делают их доступными для антителозависимого клеточного цитолиза и фагоцитоза, а взаимодействие их с макрофагами способствует разрушению инфицированных клеток [184, 214].

Однако имеются некоторые биологические различия в подклассах иммуноглобулинов IgG. Классическим носителем свойств антител является Tх-2 зависимые IgG1 антитела, на долю которых приходится более 50 % всего количества сывороточных Ig. Они наиболее полно проходят фазы созревания аффинитета, обладают высоким сродством к Fc рецепторам всех типов. Поэтому эти антитела опсонизируют клетки мишени, активируют К-клетки, армируют макрофаги, активируют комплемент. Аналогичными свойствами обладают Tх-1-зависимые IgG3 антитела. Для IgG4 антител не

свойственно связывание комплемента, он не взаимодействует с белком А золотистого стафилококка; IgG2 антитела плохо проникают через плаценту, образуются в ответ на углеводные антигены. Для синтеза полноценных иммуноглобулинов в процессе иммунного ответа необходим определенный период времени. Для иммуноглобулина G - он может составлять до трех недель и больше, поэтому целесообразно использование уже готовых препаратов иммуноглобулинов с иммунозаместительной и иммуномодулирующей целью в различных ситуациях. Причем с момента появления иммуноглобулинов для внутривенного введения отмечено их широкое использование в клинической практике [165].

В настоящее время препараты иммуноглобулинов используются с целью профилактики инфекционных заболеваний, а также лечения заболеваний, в патогенезе которых имеют значение дефекты гуморального звена иммунитета и аутоиммунный компонент. Заместительная терапия проводится с целью восполнения дефицита антител при ряде острых и хронических заболеваниях, сопровождающихся гипогаммаглобулинемией. Она может быть обусловлена или усилением катаболизма иммуноглобулинов, или нарушением их синтеза при таких состояниях как голодание, онкология, сепсис, тяжелые острые и хронические инфекции и в том числе при ожоговой болезни. Целесообразность использования препаратов иммуноглобулинов в комплексной терапии у тяжелообожженных связана с их возможностью не только восстанавливать вторичный иммунодефицит основного компонента IgG, но и восполнять широкий спектр антител против различных возбудителей (более 100 типов в человеческих иммуноглобулинах), что является основной целью при тяжелых инфекциях и сепсисе. Кроме того, внутривенные иммуноглобулины повышают активность фагоцитоза и тем самым ускоряют связывание, нейтрализацию и выведение эндотоксинов, суперантигенов и аутоиммунных компонентов. Известна роль препаратов иммуноглобулинов нормальных человеческих для внутривенного введения в модуляции системной воспалительной реакции путем

ингибирования провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1) и активированных факторов комплемента (C3b, C4b) со стимуляцией высвобождения их антагонистов. ВВИГ способны усиливать действие бета-лактамовых антибиотиков и предотвращать комплемент-опосредованное повреждение тканей и др. [147, 187, 198].

Современные препараты иммуноглобулинов нормальных человеческих для внутривенного введения отечественного и импортного производства не являются идентичными между собой. Они могут различаться по составу основного полиспецифичного иммуноглобулина IgG (90-98% в зависимости от препарата), целостности его Fc-фрагмента и концентрации субклассов IgG, IgA, IgM. Содержат различный уровень минорных компонентов (растворимые клеточные рецепторы, цитокины и их антагонисты, молекулы главного комплекса гистосовместимости, молекулярные компоненты Fc γ -фрагментов и др.), которые во многом обеспечивают иммуномодулирующее действие препарата [34, 95, 98, 108, 193].

Кратность введения и дозы иммуноглобулинов при различных ситуациях определяются индивидуально. Как правило, с иммуномодулирующей целью применяются более высокие дозы внутривенных иммуноглобулинов, чем при проведении заместительной терапии [34, 117].

Накопление знаний о механизмах действия препаратов иммуноглобулинов и результаты многочисленных клинических исследований позволили расширить показания к их применению. Вместе с тем актуальной для клинической иммунологии является проблема безопасности лечения ВВИГ, в том числе с использованием высоких доз и учетом кратности введения препаратов.

Для снижения риска, связанного с технологией получения препарата из плазмы крови производителями проводится тестирование крови, полученной от более 1000 доноров на различные вирусные инфекции, используются промышленные инактивационные методики при производстве препаратов.

Критериям безопасности использования ВВИГ также являются: антикомплементарная активность менее 5 единиц СН50/г протеина, малое содержание макроагрегатов (менее 1 % от общего содержания иммуноглобулина IgG), титр АВ антител менее 1:8, отсутствие гемолизина, активаторов прекалликреина, консервантов, активированных энзимов, токсических веществ. Необходимо декларирование титра антител для каждой партии препарата и очень низкое содержание иммуноглобулина IgA, особенно если предусмотрено применение у пациентов с врожденным дефицитом иммуноглобулина IgA [69].

Необходимо так же учитывать наличие стабилизаторов (сахароза, фруктоза, сорбитол и др.) в составе ВВИГ. Например, не рекомендуется больным с почечной патологией использовать иммуноглобулины, содержащие сахарозу. При непереносимости фруктозы не показаны иммуноглобулины, содержащие сорбитол. Также при применении ВВИГ должны учитываться уровень электролитов, осмолярность и др. Побочные реакции и непереносимость ВВИГ чаще всего связаны с нарушением режима введения препарата (скорости введения, концентрации), в большинстве случаев они протекают в легкой форме и по литературным данным встречаются примерно у 5 % пациентов. В литературе описаны единичные случаи асептического менингита, острой почечной недостаточности, а также гемолиз и ДВС-синдром при употреблении сверхвысоких доз.

Клиническая эффективность коммерческих препаратов иммуноглобулинов IgG для внутривенного введения подтверждена многими исследованиями в России и за рубежом. Анализ опубликованных работ отечественных и зарубежных исследователей свидетельствует о том, что между препаратами иммуноглобулинов G (интраглобин, октагам, сандоглобулин, биовен, габриглобин) принципиальной разницы в клинической эффективности, переносимости и приемлемости препарата пациентом нет. Из отечественных иммуноглобулинов нормальных человеческих для внутривенного введения IgG (иммуноглобулин человека

нормальный, иммуновенин, имбиоглобулин) только «Габриглобин-IgG», разработанный Государственным учреждением «Московским НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» и Российским фармацевтическим предприятием ЗАО «ИммуноГем», прошел экспериментальные и клинические испытания на содержание мономерного IgG и соответствует всем требованиям, предъявляемым к препаратам ВВИГ [34]. Учитывая особенности каждого препарата, оценивая риск возможных осложнений назначение ВВИГ должно быть задокументировано (показания, степень риска, протокол переливания). Пациент должен быть информирован о возможном риске заражения и неблагоприятных реакциях. Больным с дефицитом IgA переливание проводят только по жизненным показаниям и используют препараты с его отсутствием (интраглобин, габриглобин, сандоглобулин, октагам и др.) [34].

Таким образом, современные препараты иммуноглобулинов успешно используются в клинической практике. Они не одинаковы с технической точки зрения, хотя очень часто эквивалентны терапевтически. Для целого ряда заболеваний эффективность иммуноглобулинов доказана в контролируемых клинических исследованиях. Однако, учитывая, что ВВИГ имеют свои особенности и могут быть причиной тяжелых реакций и инфицирования больных, целесообразно использовать их по показаниям. В имеющихся публикациях мало отражена проблема регулирующего воздействия иммуноглобулинов на направленность иммунного ответа, в том числе при ожоговой болезни, а также эффективность и безопасность применения более высоких доз препаратов внутривенных иммуноглобулинов, что требует дальнейшего изучения. Одним из ключевых направлений комплексного лечения тяжелообожженных является внедрение в клиническую практику и широкое применение современных методов иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии на фоне активной хирургической тактики лечения пациентов, что стало целью настоящей работы.

Глава 2. МАТЕРИАЛ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ

2.1. Дизайн диссертационной работы

Диссертационная работа представляет собой одноцентровое ретроспективное исследование и включает поэтапный анализ и обобщение результатов клинико-иммунологических исследований, полученных в ходе выполнения научно-исследовательской и лечебно-диагностической работы в ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России за период с 2009 по 2021 г., включая 4 темы научно-исследовательских разработок (НИР) по Государственному заданию (см. табл. 1 стр. 12). Работа была одобрена локальным этическим комитетом.

В одноцентровое ретроспективное исследование включено 275 взрослых пациентов (мужчин – 174, женщин - 101) с обширными ожогами, госпитализированных для оказания специализированной высокотехнологичной медицинской помощи в Ожоговый центр ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России. Средний возраст пациентов составил $44,6 \pm 1,7$ года, общая площадь ожогового поражения – $46,4 \pm 1,4$ % поверхности тела, из них глубокие ожоги составили в среднем $16,4 \pm 1,3$ % поверхности тела.

Критерии включения в исследование: возраст более 18 лет, общая площадь ожогов более 30% поверхности тела, наличие в истории болезни анализов иммунного статуса в динамике.

Критерии исключения: сопутствующие заболевания крови, онкологические заболевания, аутоиммунные заболевания, первичные иммунодефицитные заболевания, вторичные иммунодефицитные заболевания вирусной этиологии (ВИЧ, гепатит, сифилис).

Дизайн диссертационной работы, представленный на рисунке 2.1. включает последовательные этапы анализа **33975** результатов клинико-иммунологических исследований и комплексного лечения, включая хирургические операции у **275** пациентов с обширными ожогами, а также

результаты иммунологического обследования **30** здоровых доноров для определения референсных показателей иммунного статуса и последующего их сравнительного анализа с данными пациентов.

В работе использован широкий диапазон лабораторных методов исследования:

- иммунологические (проточная цитометрия, турбидиметрия, хемилюминесценция) с определением трех типов клеток (лимфоциты, гранулоциты, моноциты) периферической крови с экспрессией фенотипических мембранных маркёров, иммунных индексов, кислородного метаболизма фагоцитарных клеток, уровня сывороточных иммуноглобулинов и циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток;
- общие биохимические и гематологические;
- клиническое обследование больных, в том числе тесты объективной оценки состояния пациента.

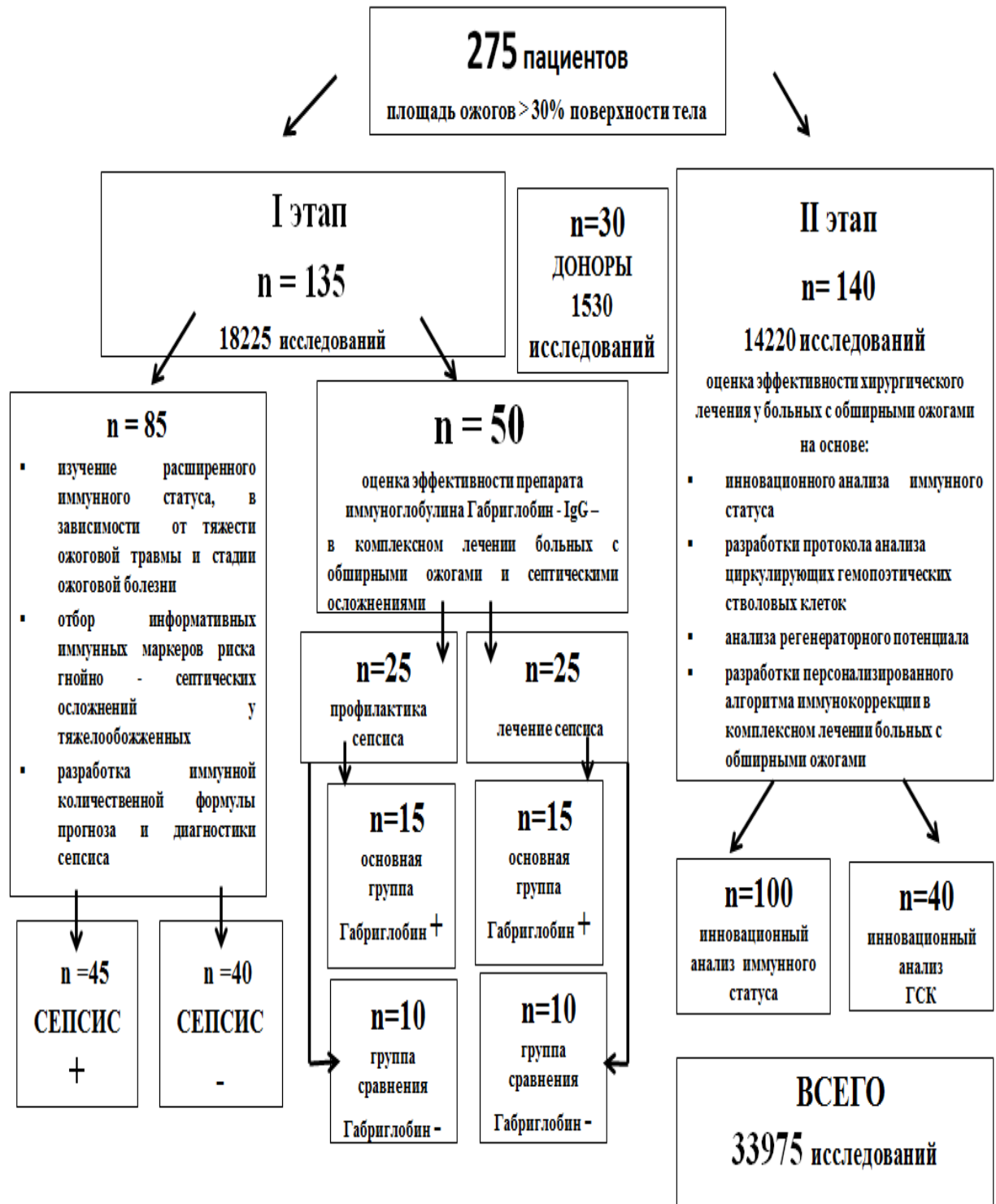


Рис. 2.1. Дизайн диссертационной работы

Первый этап диссертационной работы за период 2009-2014 гг. является поисковым и включает комплексные исследования у 135 тяжелообожженных больных, из которых у 85 пациентов проведен анализ расширенного иммунного статуса, в зависимости от тяжести ожоговой травмы (площади и глубины поражения) и стадии ожоговой болезни с последующим отбором информативных иммунных маркеров риска гнойно - септических осложнений и разработкой количественной формулы прогноза и диагностики сепсиса. У 50 других больных с обширными ожогами изучена эффективность иммунозаместительной терапии препаратом «Габриглобин-IgG» - иммуноглобулин человека нормальный для профилактики и лечения септических осложнений ожоговой болезни.

На втором этапе работы на основе полученных результатов проведена новая серия клинико-экспериментальных исследований у 140 пациентов, обследованных за период 2015-2021 гг. Для оценки эффективности хирургического лечения на основе комплексного анализа результатов иммунологических исследований у больных с обширными ожогами в исследование включено 100 пациентов (мужчин – 61, женщин - 39) с обширными ожогами. Средний возраст пациентов составил $44,0 \pm 1,5$ года, общая площадь ожогового поражения $47,7 \pm 1,5$ % поверхности тела, из них глубокие ожоги составили $16,5 \pm 1,7$ % п.т. Проведен анализ результатов иммунного статуса (более 13500 исследований) при поступлении у всех 100 пациентов, из них у 55 больных в динамике на 10-е и 30-е сутки комплексного лечения.

При разработке персонализированного алгоритма иммунокоррекции дополнительно проанализированы малоизвестные иммунные маркеры и субпопуляции гемопоэтических стволовых клеток у 40 больных в динамике (при поступлении, на 10-е сутки и 30-е сутки комплексной терапии). Для определения референсных показателей иммунного статуса за все время работы обследовано 30 здоровых доноров крови, составивших контрольную группу.

2.2. Методы комплексного лечения пациентов

Всем пациентам проводилось комплексное поликомпонентное лечение в палате интенсивной терапии с применением противоожоговых (флюидизирующих) кроватей при круглосуточном мониторинге гемодинамики и волемического статуса, проведении противошоковых мероприятий, инфузионной и анальгетической терапии, нутритивной поддержки и антимикробной терапии согласно чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. По показаниям применяли респираторную поддержку с использованием аппаратов искусственной вентиляции легких, экстракорпоральное воздействие на кровь методами ультрагемофильтрации. Хирургическое этапное лечение включало хирургическую некрэктомию, местное медикаментозное лечение ожоговых ран с использованием современных раневых покрытий, мазей на водорастворимой основе и аутодермопластику для закрытия ран.

2.2.1. Методы местного консервативного и хирургического лечения пациентов

При определении тактики местного лечения пострадавших с ожогами ориентировались на тяжесть состояния больного, площадь поверхностных и глубоких ожогов, стадию течения раневого процесса, количество раневого отделяемого, наличие инфекции.

У пациентов с поверхностными и пограничными I-II степени ожогами применяли местное консервативное лечение с использованием раневых покрытий, повязок с растворами антисептиков и мазей на водорастворимой основе. Также консервативное лечение проводилось на этапе подготовки глубоких ожогов III степени к пластическому закрытию и в послеоперационном периоде.

Основой лечения глубоких ожогов было хирургическое удаление нежизнеспособных тканей и восстановление целостности кожного покрова. Всем пациентам перед выполнением операции по пластическому закрытию ожоговых ран в зоне глубокого поражения выполнялись хирургические некрэктомии - иссечение некротических тканей с использованием хирургических инструментов и оборудования с последующей отсроченной аутодермопластикой уже гранулирующих ран.

В зависимости от площади и глубины термического поражения некрэктомии по технике выполнения подразделялись на тангенциальные или окаймляющим разрезом. Метод тангенциальной хирургической некрэктомии применялся при ожогах в пределах дермы. При этом дисковым электродерматомом послойно удалялись нежизнеспособные ткани до появления «кровяной росы» - капиллярного кровотечения. При глубоких ожогах с поражением подкожной клетчатки и глубжележащих тканей применялась некрэктомия окаймляющим разрезом. Гемостаз проводился с помощью электрокоагулятора.

Аутодермопластика обычно выполнялась отсрочено через 5-14 суток после некрэктомии. Аутодермопластика выполнялась в операционной под общим обезболиванием. Перед выполнением пластического закрытия ран всем пациентам выполнялось иссечение грануляционной ткани (удаление патологических грануляций, остаточных некрозов, выравнивание дна раны) и тщательный гемостаз. При помощи циркулярного электродерматомата с донорских участков кожи проводился забор расщепленных аутодермотрансплантатов толщиной 0,3-0,4 мм. Увеличение площади трансплантата достигалось за счет нанесения на него перфорационных отверстий с применением кожного перфоратора. Расщепленные перфорированные аутодермотрансплантаты укладывались на подготовленные раны, при необходимости фиксировались кожным степлером.

2.2.2. Методы иммунокорригирующей терапии

В исследовании по изучению эффективности иммунозаместительной терапии при профилактике и лечении сепсиса у 50 больных с ожогами использован отечественный препарат «Габриглобин-IgG» - иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий. Зарегистрирован в МЗСР России (ФСП № 42-8743-07, Изменение №1, Регистрационное удостоверение № ЛС – 000412). Состав: 1 мл 5%-ого раствора содержит иммуноглобулин G (не менее 98%), эквивалентно общему содержанию белка плазмы крови человека – 50 мг. Вспомогательные вещества: (мальтоза - 100 мг, вода для инъекций – до 1 мл).

Способ применения и дозы - согласно инструкции к препарату. Перед введением препарат согревали до комнатной температуры или температуры тела. Препарат вводили только в виде внутривенных инфузий первоначально со скоростью 0,5 мг/кг массы тела (15-20 капель в минуту) в первые 10-15 минут, затем со скоростью 30-40 капель в минуту.

Основная группа «профилактика сепсиса» - 15 пациентов получили «Габриглобин-IgG» в дозе по 50 мл (2,5 г.) внутривенно ежедневно, курс 5 дней - суммарная доза 250 мл (12,5 г.).

Основная группа «лечение сепсиса» - 15 пациентов получили «Габриглобин-IgG» в дозе по 50 мл (2,5 г.) внутривенно ежедневно, курс 10 дней - с общим объемом полученного препарата 500 мл (25 г.).

В соответствующие группы контроля «профилактики» и «лечения» сепсиса вошло по 10 больных без включения в комплексную терапию препарата «Габриглобин-IgG».

2.3. Методы исследования иммунного статуса

Для **определения фенотипических маркеров иммунного статуса** образцы периферической венозной крови пациентов собирали в пробирки с антикоагулянтом К₃ЭДТА в количестве 2,7 мл. Далее 50 мкл цельной крови смешивали с соответствующими моноклональными антителами согласно инструкции фирмы производителя с экспозицией 30 минут при 4°C, с последующим добавлением 1000 мкл лизирующего раствора BD FACS Lysing solution (BD Biosciences, США). После лизиса эритроцитов производили центрифугирование проб с последующей отмывкой фосфатно-солевым буфером и подготовкой проб для фенотипического анализа.

Фенотипирование иммунных клеток (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты) проводили методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest. В исследование был включен широкий диапазон различных иммунных маркеров - количественных (табл. 2.1), активационных (табл. 2.2) и молекул адгезии (табл. 2.3) с использованием моноклональных антител фирмы производителя BD Biosciences (США): PE Mouse IgG1 к Isotype Control (Clone MOPC-21), FITC Mouse IgG1 к Isotype Control (Clone MOPC-21), CD45 PE (Clone HI30), CD3 FITC (Clone UCHT1), CD4 FITC (Clone SK3), CD4 PE (Clone RPA-T4), CD8 FITC (Clone RPA-T8), , CD16 FITC (Clone 3G8), CD56 PE (Clone B159), CD25 PE (Clone M-A251), CD21 FITC (Clone B-ly4), CD3-FITC /HLA-DR-PE (Clone CD 3 – SK7, HLA-DR - L243), CD70 FITC (Clone 113-16), CD40 PE (Clone 5C3); фирмы производителя Beckman Coulter (Франция): CD64 PE (Clone 22), CD14 PE (Clone RMO52), CD11b FITC (Clone Bear1), CD54 FITC (Clone 84H10), CD25 FITC (Clone B1.49.9), CD95 FITC (Clone UB2), CD35 FITC (Clone J3.D3).

**Таблица 2.1. Характеристика количественных исследуемых
фенотипических маркеров иммунного статуса**

Показатель	Основные функции	Экспрессия на клетках
CD 3	Сигнальный комплекс, связанный с TCR	Т-лимфоциты
CD4	Корецептор Т-хелперов лиганд для МНС класса II	Т- хелперы/индукторы
CD4+CD25+	Т-регуляторные лимфоциты	
CD8	Корецептор Т-цитотоксических лимфоцитов	Т-цитотоксические /супрессоры
CD4/CD8	Иммунорегуляторный индекс	
CD21	Субъединица корецептора В- лимфоцитов для рецептора комплемента 2	зрелые В-лимфоциты
CD16	Основная часть рецептора Fcγ	NK-клетки, нейтрофилы, моноциты
CD56	NCAM-1	NK-клетки, моноциты
CD3+CD56+	Естественные Т-киллеры	

Таблица 2.2. Характеристика активационных исследуемых фенотипических маркеров иммунного статуса

Показатель	Основные функции	Экспрессия на клетках
CD14	Рецептор ЛПС, эндотоксинов	моноциты, гранулоциты
CD25	α – цепь рецептора для IL-2	лимфоциты, моноциты
HLA-DR	Антиген главного комплекса гистосовместимости II класса	лимфоциты, моноциты
CD95	Антиген апоптоза APO-1/Fas	лимфоциты, нейтрофилы, моноциты
CD64	Высокоаффинный Fc-гамма-рецептор для IgG	лимфоциты, моноциты, гранулоциты
CD70	Лиганд рецептора CD27, относящийся к суперсемейству ФНО	лимфоциты, нейтрофилы, моноциты
CD35	CR1 рецептор комплемента	лимфоциты, нейтрофилы, моноциты
CD40	5 член семейства рецепторов для ФНО (TNFRSF5)	лимфоциты, нейтрофилы, моноциты

Таблица 2.3. Характеристика адгезионных исследуемых фенотипических маркеров иммунного статуса

Показатель	Основные функции	Экспрессия на клетках
CD11b	Интегрин Mac-1	лимфоциты, нейтрофилы, моноциты
CD54	ICAM-1 лиганд для интегрина LFA-1	лимфоциты, нейтрофилы, моноциты

Для оценки гуморального иммунного звена кровь забиралась у пациентов из периферического системного кровотока в сухие пробирки, подвергалась центрифугированию 15 минут при 1500 об/мин. Уровень основных классов иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) в полученной сыворотке крови измеряли методом турбидиметрии на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Screen Master Plus фирмы "Hospitex Diagnostics S.r.L." (Италия) в соответствии с инструкцией производителя реагентов и калибровочных растворов Biosystems (Испания).

Анализ кислородного метаболизма фагоцитов проводили методом хемилюминесценции на люминометре L1251 (LKB, Sweden), усиленной добавлением $1 \cdot 10^{-6}$ М люминола и 25 мМ люцигенина, индуцированной зимозаном (Sigma, Швейцария), опсонизированным сывороткой здоровых доноров в 10 мкл. цельной крови в течение 30–40 мин, выражая ее в мВ/100 фагоцитов (в пересчете на нейтрофилы). Окисление в присутствии люминола позволяло определять внутриклеточную генерацию активных форм кислорода, в присутствии люцигенина – выявляло только внеклеточную генерацию супероксидного аниона кислорода.

Также использовали мультиплексный анализ на анализаторе Synergy 2 SLAD (США). Для исследования забор периферической венозной крови

пациентов осуществляли в пробирки с антикоагулянтом КЗЭДТА. Реакцию проводили в 96-ти луночных прозрачных полистироловых планшетах с плоским дном, для чего смешивали в объемах – 5 мкл цельной крови пациента, 150 мкл раствора люминола или люцигенина, 25 мкл суспензии опсонизированного зимозана. Определяли среднее значение суммарного интеграла импульсов, высчитанное на площади под кривой на протяжении 50 мин реакции из измерений четырех дублирующих образцов. В итоге ХЛ выражали в условных единицах (УЕ) на 10 000 лейкоцитов за вычетом общих лимфоцитов.

Индексы эндогенной интоксикации рассчитывали, используя показатели общего клинического анализа крови по формулам:

лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) по Я.Я. Кальф-Калифа [23]:

$$(4 \times \text{миелоциты \%} + 3 \times \text{метамиелоциты \%} + 2 \times \text{п/я нейтрофилы \%} + \text{сегментоядерные нейтрофилы \%}) \times (\text{плазмоциты} + 1)$$

$$(\text{лимфоциты \%} + \text{моноциты \%}) \times (\text{эозинофилы \%} + 1)$$

индекс ядерного сдвига формулы крови (ИЯС) по Н.Н. Боброву [9]:

$$\text{миелоциты \%} + \text{метамиелоциты \%} + \text{п/я нейтрофилы \%}$$

$$\text{сегментоядерные нейтрофилы \%}$$

индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) по Н.И. Яблучанскому [45]:

$$\text{нейтрофилы общие \%}$$

$$\text{лимфоциты \%} + \text{моноциты \%}$$

2.4. Методы анализа регенераторного потенциала на этапах хирургического лечения

Для оценки регенераторного потенциала у ожоговых больных был использован метод проточной цитометрии с изучением циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток и их субпопуляций в периферической крови.

На основе известных данных о поверхностных маркерах ГСК для идентификации циркулирующих стволовых клеток использовали набор моноклональных антител фирмы BD Biosciences (США): CD 45 PerCPCy5.5 (Clone HI30), CD 34 FITC (Clone 581/CD34), CD 38 PE (Clone HIT2) и фирмы Miltenyi Biotec (Германия) CD 133 PE (Clone AC133).

Образцы периферической венозной крови собирали в стандартные стерильные пробирки с антикоагулянтом К₃ЭДТА в объеме 2,7 мл. Для фенотипирования субпопуляционного состава ГСК проводили трехцветное окрашивание клеток с использованием панели моноклональных антител к соответствующим маркерам: CD45CD34CD38 и CD45CD34CD133. Подготовка проб для анализа проводили в полистероловых пробирках объемом 5 мл, совместимых с проточным цитометром, для чего смешивают по 5 мкл соответствующих моноклональных антител и 100 мкл цельной крови с экспозицией 20 минут, далее добавляют 1000 мкл лизирующего раствора BD FACS Lysing solution (BD Biosciences, США), через 20-30 минут после лизиса эритроцитов выполняли фенотипирование в подготовленных пробах на проточной цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur (Becton Dickinson, США). С использованием программы для проточной цитометрии CellQuest поэтапно выделяли ГСК и их субпопуляции на основе сбора не менее 5×10^5 клеток (событий) и Dot Plot анализа образцов с расчетом относительного и абсолютного уровня ГСК разных фенотипов, в том числе жизнеспособных субпопуляций ГСК, а также расчетом соотношения зрелых и незрелых субпопуляций ГСК.

2.5. Методы клинико-лабораторной диагностики сепсиса у обожженных

Клинико-лабораторная диагностика ожогового сепсиса проводилась по критериям, разработанным в Институте хирургии им. А. В. Вишневского [1]:

- внезапное ухудшение общего состояния больного, не соответствующее стадии развития заболевания и характеру течения раневого процесса;
- высокая лихорадка постоянная или гектическая с ознобами;
- расхождение температуры тела и пульса;
- прогрессирующее ухудшение общего состояния, несмотря на активное лечение, нарушение гемодинамики, развитие почечной и печеночной недостаточности;
- ухудшение состояния ожоговой раны с появлением вторичных некрозов, атрофичных грануляций;
- прогрессирование анемии ($Hb \leq 90$ ЕД);
- лимфопения <10 клеток\л, нейтрофилез, сдвиг формулы крови влево;
- возрастание СОЭ >60 мм\час;
- бактериальная обсемененность ожоговых ран выше критических величин;
- выделение микробов в составе ассоциации $\geq 4-5$ микроорганизмов;
- стойкая бактериемия, выявление ассоциации микроорганизмов в гемокультуре;

В первую очередь учитывались клинические признаки и такие лабораторные изменения, как стойкая, не поддающаяся коррекции анемия, лимфопения, увеличение СОЭ, положительные посевы крови в динамике [3].

2.1. Статистические методы обработки данных

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ GraphPad Prism 7.0 и Microsoft Office Excel 2010 с использованием методов вариационной статистики и непараметрических критериев. Количественные признаки, подчиняющиеся законам нормального распределения, представлены в виде M (среднее значение) и m (ошибка среднего значения) ($M \pm m$). При распределении количественных переменных, отличных от нормального, рассчитывали медиану и квартили первого и третьего порядка (Me [Q1; Q3]). Для расчета статистической значимости использовали критерий χ^2 - квадрат Пирсона, t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Использовали метод анализа расчета степени иммунной недостаточности (СИН) и степени иммунной стимуляции (СИС) (А. М. Земсков и др., 1995) по формуле:

$$(\text{показатель больного/нормальный показатель} - 1) \times 100\%$$

Если рассчитанная величина имеет знак «минус», у больного определяется иммунная недостаточность, если «плюс» - гиперфункция (стимуляция) иммунной системы. Когда полученная величина лежит в интервале 1-33%, это оценивается как первая степень иммунных расстройств, что является транзиторным состоянием и не используются как достоверные изменения. Диапазон колебаний 34-66% соответствует второй степени, превышение 66% - третьей [17, 16]. В последних двух случаях результаты принимались за достоверные и использовались для статистической обработки.

Глава 3. ИММУННЫЙ СТАТУС ПОСТРАДАВШИХ ОТ ОЖОГОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЫ И СТАДИИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ

3.1. Иммунный статус пострадавших от ожогов в зависимости от стадии ожоговой болезни и этиологии ожоговой травмы

Изучение иммунных изменений в различные периоды ожоговой болезни крайне необходимо для понимания развития патологического процесса при ожогах и разработки обоснованных иммунотерапевтических подходов в комплексном лечении больных и определения рациональной тактики хирургического лечения глубоких ожоговых ран.

Для решения данной задачи были проведены поисковые исследования по изучению широкой панели маркеров иммунокомпетентных клеток (лимфоидные и фагоцитарные), кислородного метаболизма фагоцитов и уровня основных классов иммуноглобулинов у обожженных в различные периоды ожоговой болезни, с целью выявления изменений в их количестве, функциональной активности и определения прогностической значимости.

В стадию ожогового шока после бытовой травмы, было обследовано 11 больных с общей площадью ожогов в среднем $44 \pm 4,4$ % поверхности тела, при этом глубокие ожоги составили в среднем $11 \pm 2,9$ % поверхности тела. У 27,3% больных ожоги сочетались с термоингаляционным поражением. Анализ полученных результатов показал, что характер изменений отдельных параметров иммунного статуса в группе обследованных больных был неоднородным и разнонаправленным [15] (табл. 3.1).

Таблица 3.1. Изменения параметров иммунного статуса у пациентов с обширными ожогами в стадии ожогового шока при бытовой травме

Параметры иммунного статуса	Характер изменений параметра иммунного статуса пациентов: повышение ↑ снижение ↓	Количество пациентов с нарушением параметров иммунного статуса, n (%)	Показатели иммунного статуса пациентов, (M±m)	Показатели иммунного статуса здоровых доноров, (M±m)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	↑	7 (63,6)	$15,9 \pm 1,5^*$	$6,0 \pm 0,2$
CD64 ⁺ Гранулоциты, %	↑	9 (81,8)	$72,1 \pm 8,8^*$	$3,2 \pm 0,5$
Кислородный метаболизм фагоцитов (ХЛ), Мв\100 фагоцитов	↑	4 (36,4)	$36,1 \pm 8,2^*$	$12,3 \pm 5,8$
Лимфоциты, %	↓	4 (36,4)	$5,6 \pm 1,2^*$	$30,9 \pm 1,1$
Иммуноглобулин IgG, г/л	↓	8 (72,7)	$5,3 \pm 0,4^*$	$9,9 \pm 0,4$

Примечание. ХЛ - хемилюминесценция, * - $p < 0,05$ достоверные различия по сравнению с показателями здоровых доноров

Так у 7 (63,6) % больных отмечено повышение уровня лейкоцитов от $11,5 \times 10^9/\text{л}$ до $23,0 \times 10^9/\text{л}$ ($M = 15,9 \pm 1,5 \times 10^9/\text{л}$). У 9 (81,8 %) больных резко возрос относительный уровень гранулоцитов с экспрессией активационного, высокоаффинного Fc-γ рецептора CD64⁺ от 26,0% до 98,9% ($M = 72,1 \pm 8,8\%$) в сравнении со значениями у здоровых доноров ($M = 3,2 \pm 0,5\%$). В то же время у 4 -х (36,4 %) пациентов с обширными ожогами общей площадью от 52 % до 70 % п. т. отмечено существенное возрастание, в сравнении с группой здоровых доноров, кислородного метаболизма фагоцитов от 19,8 до 65,4 Мв\100 фагоцитов ($M = 36,1 \pm 8,2$ Мв\100 фагоцитов) с развитием глубокой относительной лимфопении от 3% до 10 % ($M = 5,6 \pm 1,2$ %). У 8 (72,7 %) больных отмечался дефицит ключевого иммуноглобулина IgG от 3,5 до 7,0

г/л ($M=5,3\pm0,4$ г/л), когда как у здоровых доноров уровень IgG составил 7,2-16,4 г/л ($M=9,9\pm0,4$). Дефицит иммуноглобулина IgM выявлен у двух (18,2%) пациентов - 0,48 г/л и 0,6 г/л, причем в сочетании с дефицитом иммуноглобулина G - 5,0 г/л и 6,5 г/л соответственно, что явилось свидетельством тяжелого поражения гуморальной системы иммунитета в стадию ожогового шока. У двух крайне тяжелых пациентов с общей площадью ожогов 63 % п. т. и 70 % п. т. развился глубокий дефицит естественных киллеров ($CD16^+$) - 3,2% и 2,7% при норме 6,5% - 17,8% [15].

Важным аспектом тяжелого течения ожоговой болезни является психоэмоциональный стресс пострадавших, особенно при массовых катастрофах. Поступление больных с обширными ожогами в Ожоговый центр ИХВ после массовой трагедии в замкнутом пространстве в клубе «Хромая лошадь» г. Перми позволило получить редкие данные на 1-2 сутки после ожоговой травмы о состоянии иммунитета в период ожогового шока, и сравнить их с данными иммунного статуса больных с бытовыми ожогами.

У 9 больных с ожогами общей площадью в среднем $40,1\pm8,6$ % поверхности тела глубокие ожоги составили в среднем $27,5\pm8,6$ % п. т. в сочетании с тяжелым термоингаляционным поражением и отравлением продуктами горения углекислого газа. Все обследованные находились в «особенной» ситуации и в одних и тех же условиях катастрофы, в замкнутом пространстве, под влиянием сильнейшего психоэмоционального стресса, что позволяет считать данную группу фактически «однородной» по причинному фактору [15]. Результаты представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Изменения параметров иммунного статуса у пациентов с обширными ожогами в стадии ожогового шока при массовой катастрофе

Параметры иммунного статуса	Характер изменений параметра иммунного статуса пациентов: повышение ↑ снижение ↓	Количество пациентов с нарушением параметров иммунного статуса, n (%)	Показатели иммунного статуса пациентов, (M±m)	Показатели иммунного статуса здоровых доноров, (M±m)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	↑	9 (100)	13,4±0,7*	6,0±0,2
Палочкоядерные гранулоциты, %	↑	9 (100)	16,0±3,3*	5,3±2,1
CD64 ⁺ Гранулоциты, %	↑	9 (100)	88,1±3,4*	3,2±0,5
Кислородный метаболизм фагоцитов (ХЛ), Мв\100фагоцитов	↑	5 (55,6)	24,4±3,6 *	12,3±5,8
Лимфоциты, %	↓	8 (88,9)	6,07±1,05*	30,9±1,1
Естественные киллерные лимфоциты (NK-клетки) CD16 ⁺	↓	4 (44,4)	3,4±0,1*	10,5±0,8
HLA-DR ⁺ моноциты, %	↓	7 (77,8)	26,5±3,9*	83,5±2,1
IgG, г/л	↓	9 (100)	0,93±0,3 *	9,9±0,4

Примечание. ХЛ - хемилюминесценция, * - $p < 0,05$ достоверные различия по сравнению с показателями здоровых доноров

Как видно из таблицы 3.2, у всех 9 (100%) больных был выявлен глубокий дефицит IgG, уровень которого составлял 0,93±0,3 [0; 3,0] г/л. Отмечалось резкое возрастание CD64⁺ гранулоцитов 88,1±3,4 [70,0; 98,0] %. У 8 (88,9%) пациентов развилась глубокая относительная лимфопения 6,07±1,05 [2,5; 9,0] %. У 5 (55%) больных произошло существенное возрастание уровня кислородного метаболизма фагоцитов 24,4±3,6 [15,5;

36,9] Мв/100 фагоцитов. У всех пострадавших выявлено возрастание лейкоцитоза до $13,4 \pm 0,7 \times 10^9$ [$10,8 \times 10^9$; $17,5 \times 10^9$] /л и повышение палочкоядерных гранулоцитов до $16,0 \pm 3,3$ [8,0; 39,0] %. Дефицит естественных киллеров (CD16⁺) развился у 4 (44,4 %) больных, их содержание составило $3,4 \pm 0,1$ [2,9; 3,6] % при норме $10,5 \pm 0,8$ [6,5; 17,8] %. Характерно, что высокая степень выраженности воспалительного процесса у 7 (77,8 %) пациентов подтверждалась резким снижением уровня HLA-DR⁺ моноцитов $26,5 \pm 3,9$ [5,9; 44,0] % [15].

Существенные изменения иммунной системы в результате массовой катастрофы выявлены практически у всех пострадавших и носили более глубокий негативный характер, чем в группе больных, получивших бытовую травму. Так, уровень иммуноглобулина IgG был значительно ниже у пострадавших в массовой катастрофе. У ряда больных при очень обширных ожогах с общей площадью от 50 до 80% п.т. иммуноглобулин IgG полностью исчез из циркуляции, что никогда не приходилось наблюдать в предыдущих исследованиях. У других больных регистрировался критически низкий уровень иммуноглобулина IgG 0,9 г/л - 3,0 г/л. В отличие от группы с бытовым поражением, при массовой катастрофе отмечена тенденция к более высокой активации CD64⁺ гранулоцитов с одномоментным повышением числа палочкоядерных гранулоцитов и глубоким дефицитом моноцитов с экспрессией HLA-DR⁺ антигена и естественных киллерных лимфоцитов [15].

В стадию острой ожоговой токсемии обследовано 13 пациентов с общей площадью ожогов в среднем $33,6 \pm 4,8\%$ поверхности тела и глубокими ожогами $16,2 \pm 2,8$ [2,0; 30,0] %, причем у 3-х больных (23,1%) ожоги сочетались с термоингаляционным поражением.

У 11 (84,6 %) пациентов развился дефицит иммуноглобулина G $3,0 \pm 0,6$ [0,4; 7,0] г/л, причем резкий дефицит иммуноглобулина G (1,0– 2,0 г/л) был отмечен при обширных ожогах с площадью поражения от 45% до 70 % поверхности тела.

У всех 13 (100%) пациентов значительно повысилось содержание гранулоцитов с экспрессией CD64⁺ $71,1 \pm 7,8$ [21,0; 99,5] %. При этом у 6 (46,2 %) пациентов этот показатель вырос до критически высоких цифр – 87%– 99,5 %, при норме < 15,0%. Кислородный метаболизм фагоцитов усилился у 8 (61,5 %) больных, составив $34,6 \pm 2,6$ [19,5; 40,4] Мв/100 фагоцитов.

У 7 (53,8 %) больных отмечался лейкоцитоз $18,5 \pm 2,1 \times 10^9$ [10,5×10⁹; 25,9×10⁹] /л, при этом возрастание палочкоядерных гранулоцитов отмечалось у 11 (84,6 %) пациентов, составляя в среднем $16,6 \pm 2,0$ %. В то же время, у 5 (38,4 %) больных отмечен дефицит моноцитов с экспрессией HLA-DR⁺ $34,6 \pm 1,4$ [29,6; 37,4] % и дефицит естественных киллеров (CD16⁺) $3,1 \pm 0,5$ [2,3; 4,2] % при норме NK- клеток 6,5%-17,8%.

Таким образом, в период острой ожоговой токсемии у больных с обширными ожогами сохраняются существенные изменения ряда ключевых иммунных параметров [15].

В стадии септикотоксемии ожоговой болезни - обследовали 15 пациентов с обширными ожогами с общей площадью в среднем $33,4 \pm 5,2$ %, при этом глубокие ожоги составили $14,4 \pm 2,6$ % поверхности тела. У 100% обследуемых пациентов отмечалось повышение количества палочкоядерных гранулоцитов $20,2 \pm 3,2$ [12,0; 30,5] % и гранулоцитов с экспрессией CD64⁺ $69,0 \pm 15,5$ [31,0; 99,8] %, причём у 9 (60 %) больных до очень высоких цифр 94,0% – 99,7%. Лейкоцитоз у всех пострадавших составил $16,5 \pm 3,5 \times 10^9$ [11,4×10⁹; 26,9×10⁹] /л, а при обширных ожогах с общей площадью от 35% до 50% поверхности тела развился дефицит клеточного звена иммунитета. У 9 (60 %) пациентов с общей площадью ожогов от 30% до 50 % поверхности тела регистрировался умеренный дефицит иммуноглобулина IgG $5,8 \pm 0,7$ [4,5; 7,0] г/л. Таким образом, и через 10-14 дней после ожоговой травмы сохраняются значимые нарушения иммунной системы [15].

Тяжесть больного в периоде ожоговой септикотоксемии определяется характером ожоговых ран и связана с наличием инвазивной раневой инфекции и нагноением некротических тканей, приводящих к развитию высокой ожоговой эндогенной интоксикации за счет резорбции продуктов тканевого распада и жизнедеятельности бактерий.

Лечение обожженных в периоде септикотоксемии должно быть направленно на профилактику гнойно-септических осложнений ожоговой болезни и подготовку пациента к более раннему аутопластическому закрытию ран, поскольку ожоговые раны являются входными воротами и питательной средой для широкого спектра микроорганизмов и в то же время через обширную раневую поверхность постоянно теряются тепло и многочисленные константы организма (белок, вода, соли и др.). Тяжелые иммунные нарушения на фоне микробной интоксикации организма и нейродистрофических расстройств, свойственные ожоговой болезни – это также следствие существования обширных ожоговых ран.

3.2. Иммунный статус пострадавших от ожогов в зависимости от тяжести ожоговой травмы

Анализ изменений иммунного статуса в зависимости от тяжести ожоговой травмы, критерием которой была общая площадь ожогов (менее 30% п.т., 30-50% п.т., >50% п.т.) проведен у больных в различные периоды ожоговой болезни (ожоговый шок, острая ожоговая токсемия, септикотоксемия).

При площади ожога >30% поверхности тела развивается более выраженная эндогенная интоксикация организма с бактериальным компонентом на фоне лейкоцитоза (рис. 3.1) и сдвига формулы крови влево с возрастанием лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) (рис. 3.2) вплоть до терминальной стадии при ожогах более 50% поверхности тела, как правило, с токсическим повреждением нейтрофилов.

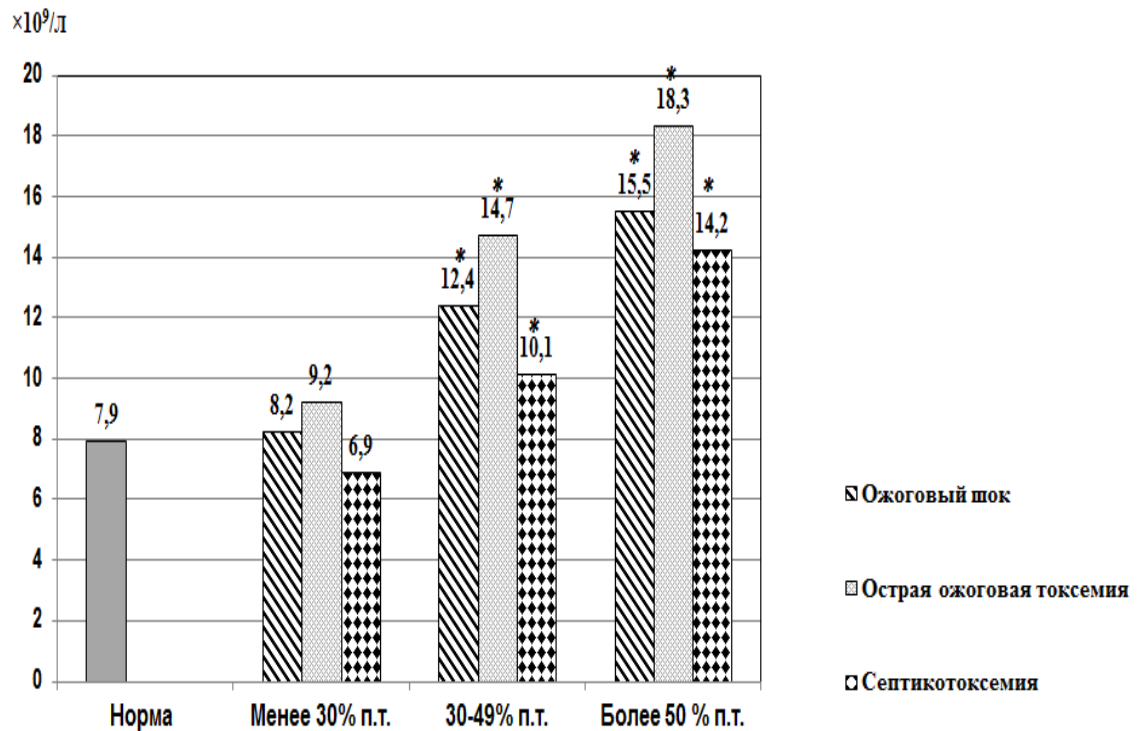


Рис. 3.1. Зависимость изменений среднего уровня лейкоцитов от площади ожогового поражения и периода ожоговой болезни, *- $p < 0,05$ по сравнению с нормой

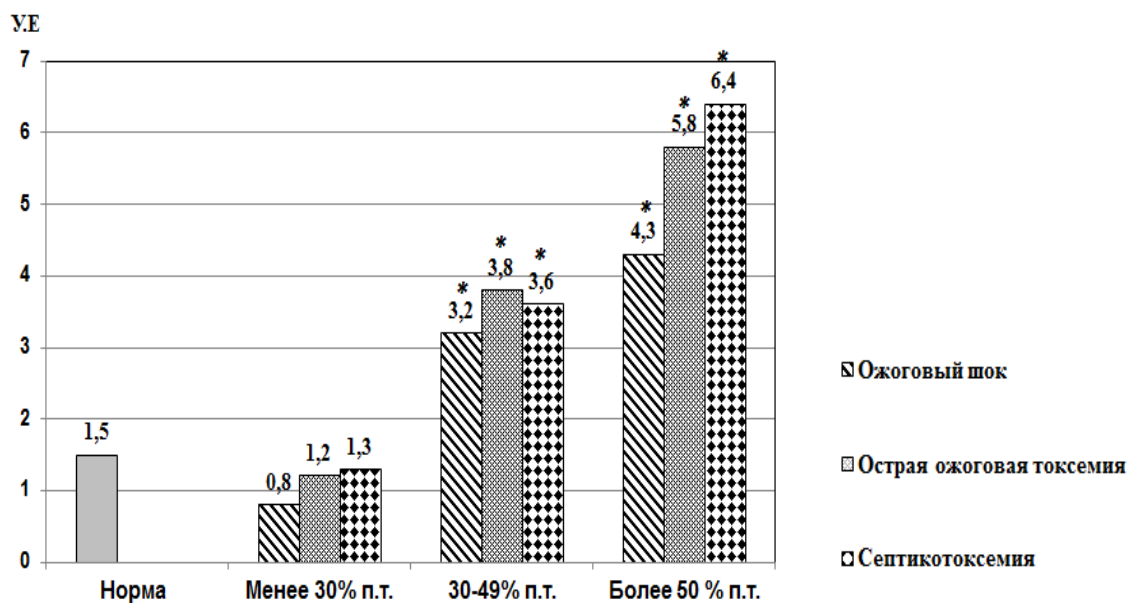


Рис. 3.2. Зависимость изменений лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) от площади ожогового поражения и периода ожоговой болезни, *- $p < 0,05$ по сравнению с нормой

При большем ожоговом поражении относительные показатели гранулоцитов с экспрессией провоспалительного высокоаффинного Fcγ-рецептора CD64+ значительно выше, по сравнению с пациентами с меньшей площадью ожогов (рис. 3.3). Отмечено выраженное усиление кислородного метаболизма фагоцитов на фоне глубокого дефицита активированных HLA-DR+ моноцитов, отражающих степень и выраженность воспалительного процесса.

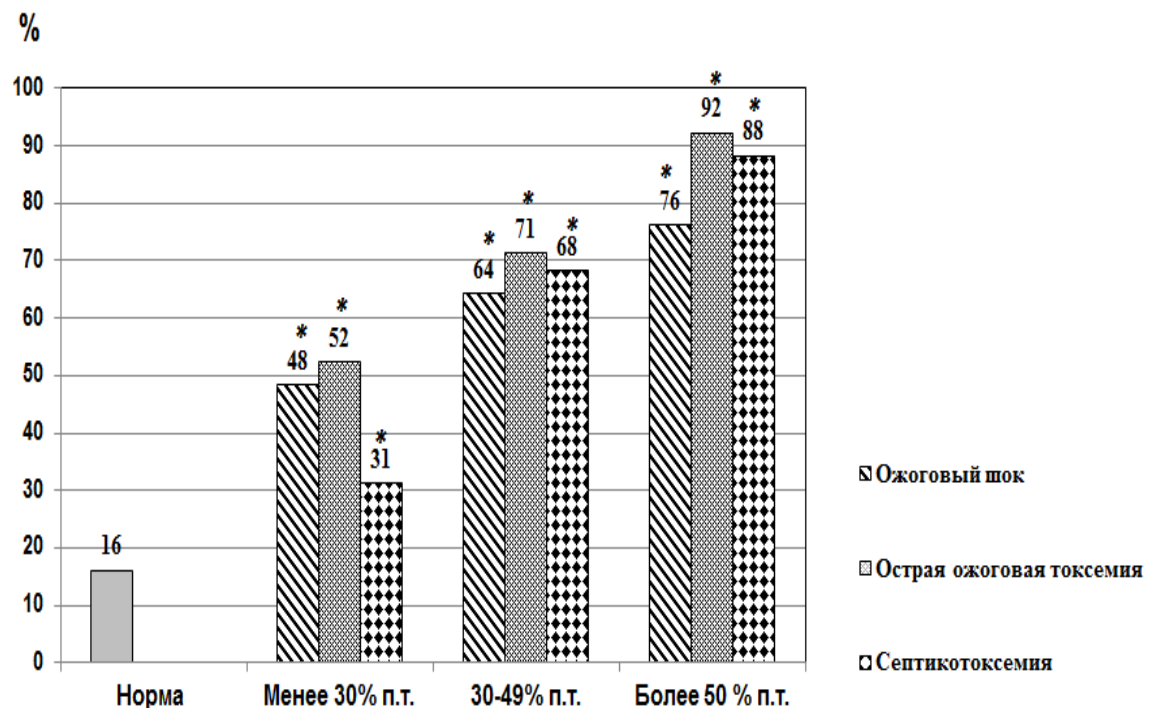


Рис. 3.3. Зависимость изменений гранулоцитов CD64+ от площади ожогового поражения и периода ожоговой болезни, *- $p < 0,05$ по сравнению с нормой

При площади ожогового поражения $>30\%$ п.т. практически сразу возникает дефицит ключевого иммуноглобулина IgG, причем при большей степени ожогов, самостоятельно практически он не восстанавливается (рис. 3.4).

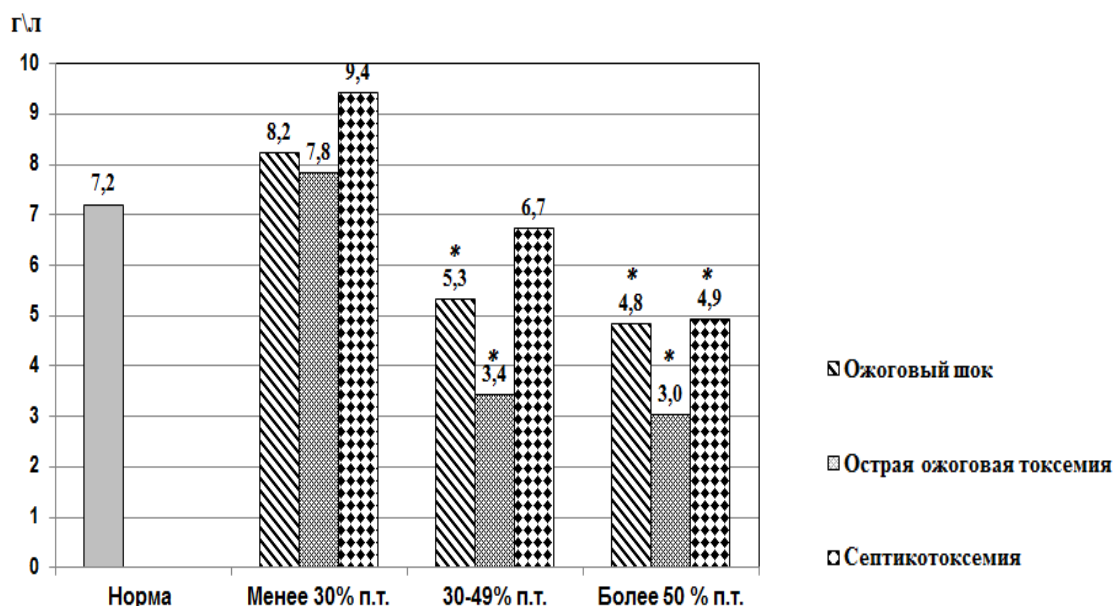


Рис. 3.4. Зависимость уровня иммуноглобулина IgG от площади ожогового поражения и периода ожоговой болезни, *- $p < 0,05$ по сравнению с нормой

У трети пациентов возник сочетанный дефицит иммуноглобулинов IgG и IgM, отражающий глубокое поражение гуморальной системы иммунитета.

В то же время при ожоговом поражении $>30\%$ п.т. происходило увеличение числа больных с дефицитом естественных киллеров ($CD16^+$) и киллерных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$), тогда как при площади ожогов до 30% п.т. отмечалась существенная положительная динамика иммунного статуса, сопряженная с улучшением общего состояния пациентов и их иммунной системы в процессе комплексного лечения.

Результаты позволили выявить четкую зависимость изменений исследуемых параметров иммунного статуса от тяжести ожоговой травмы. При обширных ожогах $>30\%$ поверхности тела одновременно развиваются два альтернативных процесса – гиперактивация иммунной системы (лейкоцитоз со сдвигом формулы крови влево, активация гранулоцитов с экспрессией высокоаффинного Fcγ-рецептора ($CD64^+$), усиление кислородного метаболизма фагоцитов и функциональная активация HLA-DR⁺ моноцитов) и её глубокий дефицит (общие лимфоциты, Т-лимфоциты и

их субпопуляции (Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты), естественные киллеры, иммуноглобулин IgG).

В зависимости от тяжести ожоговой травмы, особенно у пострадавших при массовом поражении, происходят более глубокие и разноплановые иммунологические изменения: возникает более выраженный дефицит IgG, лимфоцитов и естественных киллеров, HLA-DR⁺ моноцитов, усиливаются лейкоцитоз со сдвигом формулы крови влево и кислородный метаболизм фагоцитов, длительно сохраняются очень высокие значения CD64⁺ гранулоцитов.

3.3 Клинический пример

Пациентка Н., 27 лет, травму получила 04.12.2009 г. при пожаре в ночном клубе г. Перми. СМП госпитализирована в МУЗ МСЧ №9 г. Пермь, где больной начато проведение противошоковой терапии. Санитарной авиацией на 2-е сутки после травмы больная переведена в ожоговый центр Института хирургии им. А.В. Вишневского для дальнейшего лечения.

Диагноз: Ожог пламенем лица, шеи, туловища, верхних и нижних конечностей, ягодиц I-II-IIIAB-IVст 70% п.т. (IIIB-IVстепени-55% п.т.). Термоингаляционная травма III степени. Ожог конъюнктивы глаз II степени. Ожог кожи век II степени. Отравление продуктами горения. Септикотоксемия. Двусторонняя пневмония. Сепсис. Эзофагит. Острая эрозия пищевода. Очаговый гастрит. Бульбит.

При поступлении состояние больной крайне тяжелое. Тяжесть состояния больной обусловлена крайне тяжелым ожоговым шоком, интоксикацией на фоне обширного ожогового поражения (70% п.т.) и отравления продуктами горения, нарастающей дыхательной недостаточностью на фоне тяжелой термоингаляционной травмы III степени. Местно: ожоговые раны на лице, шее, туловище, верхних и нижних конечностях, ягодицах в виде обрывков эпидермиса, деэпителизированных поверхностей розового, багрового и белесого цвета. Верхние конечности

были отечны, при этом отек за время наблюдения нарастал, в области кистей и предплечий ожоговые раны были в виде циркулярно расположенного струпа.

Больная госпитализирована в реанимационное отделение в абактериальную палату с ламинарным потоком воздуха, где в связи с нарастающей дыхательной недостаточностью больная переведена на ИВЛ. При обследовании выявлено: ЭГДС - эзофагит, острая эрозия пищевода, очаговый гастрит, бульбит. ФБС – термоингаляционная травма III степени.

В иммунном статусе на 3-и сутки после травмы отмечается сильнейший дисбаланс иммунной системы, проявляющийся резким возрастанием показателей системной воспалительной реакции (рис. 3.5): лейкоцитоз со сдвигом формулы крови влево и сильнейшем повышении индекса эндогенной интоксикации ЛИИ в терминальной фазе с микробным компонентом, повышение нейтрофилов с экспрессией активационных маркеров $CD64^+$, $CD70^+$, $CD95^+$, кислородного метаболизма фагоцитов на уровне генерации внутриклеточных активных форм кислорода, а также дефицит $HLA-DR^+$ моноцитов (рис. 3.6) патогномичный для воспалительного процесса.

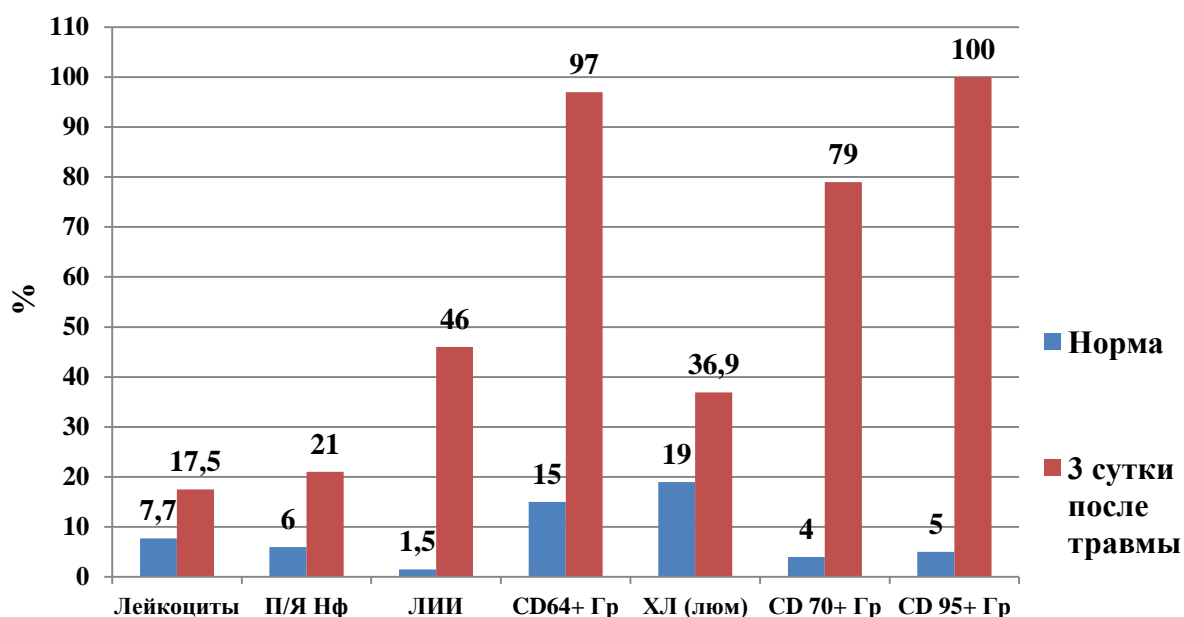


Рис. 3.5. Иммунные маркеры системной воспалительной реакции пациентки Н. на 3 сутки после травмы

При этом отмечается абсолютный глубокий дефицит клеточного иммунного звена на уровне общих лимфоцитов и их популяций: Т-лимфоцитов и иммунорегуляторных Т-хелперов $CD4^+$, $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллеров $CD16^+$, а также недостаточность гуморального клеточного компонента В-лимфоцитов при полном отсутствии ключевого иммуноглобулина IgG (рис. 3.6, 3.7).

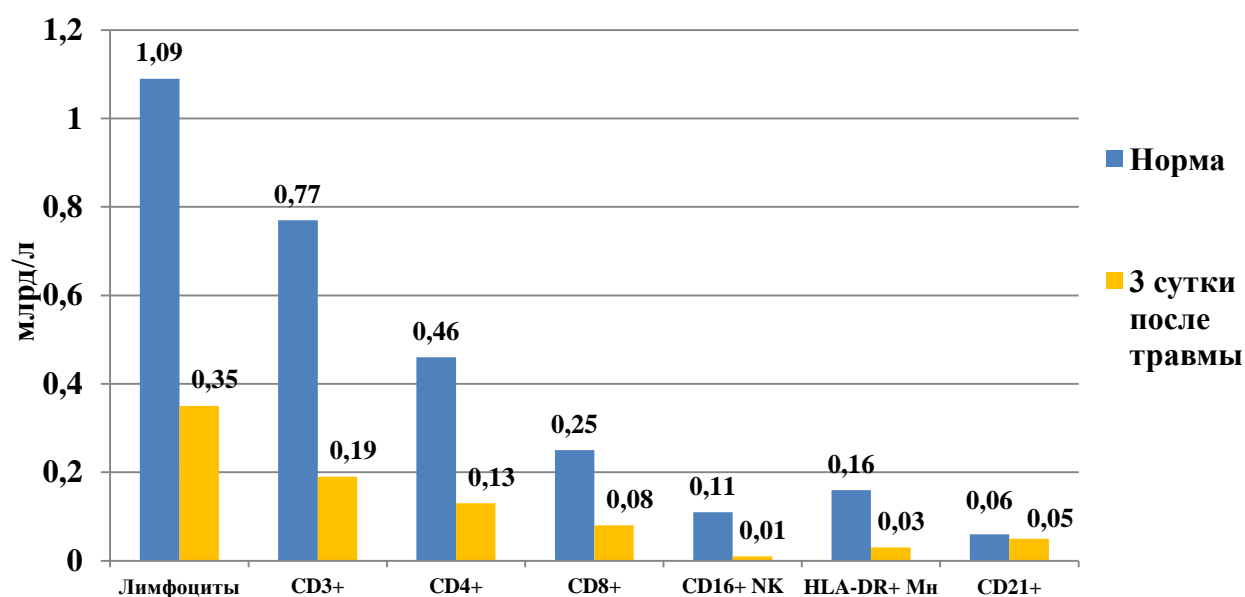


Рис. 3.6. Показатели клеточного иммунного звена пациентки Н. на 3 сутки после травмы

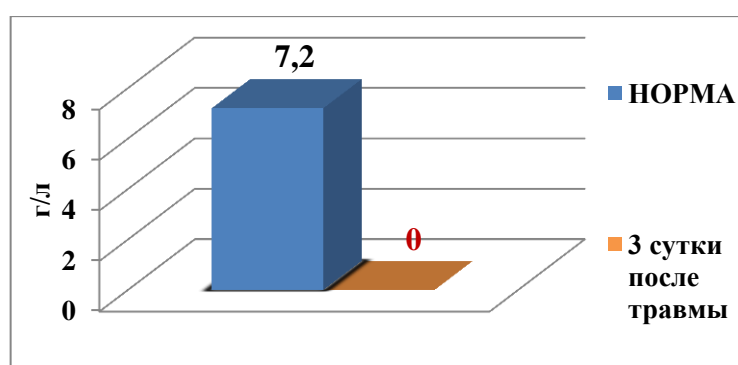


Рис. 3.7. Уровень иммуноглобулина IgG пациентки Н. на 3 сутки после травмы

Лечение больной продолжалось в палате реанимации, где проводилась комплексная, интенсивная, противошоковая терапии, включающая антибиотикопрофилактику, энтеральное и парентеральное питание, лечение

осложнений со стороны ЖКТ, санационные бронхоскопии, ингаляционную терапию. Несмотря на проводимую интенсивную терапию у больной сохранялась гипотермия, лимфопения, лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, гипо- и диспротеинемия, высокий уровень РСТ=10 нг/л, низкий уровень иммуноглобулина Ig G, что не позволяло исключить генерализацию инфекции в ранние сроки течения ожоговой болезни. Несмотря на комплексную интенсивную терапию, течение ожоговой болезни осложнилось развитием двусторонней пневмонии, сепсиса с высевами из крови и разных локусов ассоциации полирезистентной микробной флоры (табл. 3.3).

В связи с этим больной проводилась деэскалационная антибиотикотерапия с использованием неоднократных курсов и различных схем антимикробной терапии: Ципрофлоксацин+Метрогил, Тиенам+Ванкомицин, Меронем+Дифлюкан, Диоксидин+Кансидас, Тиенам+Ванкомицин+Вориконазол, Амикацин, Ломефлоксацин.

Таблица 3.3. Результаты микробиологического исследования

Раневая поверхность	Бронхиальный лаваж	Посевы крови
09.12.09 - Enterococcus spp., Acinetobacter spp. 18.12.09 – Acinetobacter spp. 21.12.09 - Acinetobacter spp., Staphylococcus epidermidis 25.12.09 - Acinetobacter spp., Pseudomonas aeruginosa	24.12.09 - Pseudomonas aeruginosa 12.01.10 - Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp. 18.01.10 - Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Candida spp.	1.01.10 - Klebsiella pneumoniae 14.01.10 - Staphylococcus aureus 27.01, 29.01. и 3.02.10 - Klebsiella pneumoniae 04.02., 25.02. и 10.03.10 - роста микрофлоры не получено.

Больной было выполнено 2 сеанса гемосорбции ЛПС на полимиксиновой колонке, а также была продолжена комплексная, интенсивная терапия в условиях флюидизирующей кровати в абактериальной палате с ламинарным потоком воздуха (рис. 3.8), включающая ИВЛ, инфузионную терапию, направленную антибиотикотерапию, энтеральное и

парентеральное питание, лечение осложнений со стороны ЖКТ, санационные бронхоскопии, ингаляционную терапию, иммунокорректирующую терапию, местное лечение ран.



Рис. 3.8. Лечение пациентки Н. в условиях флюидизирующей кровати в абактериальной палате с ламинарным потоком воздуха

Для восстановления уровня иммуноглобулина G применялась курсовая иммунозаместительная терапия препаратом ВВИГ Габриглобин по 50 мл в сутки (рис. 3.9) в комплексном лечении пациентки под контролем иммунного статуса и оценкой эффективности, в том числе на этапах проведенного хирургического лечения пациентки (табл. 3.4, рис. 3.10, 3.11, 3.12).

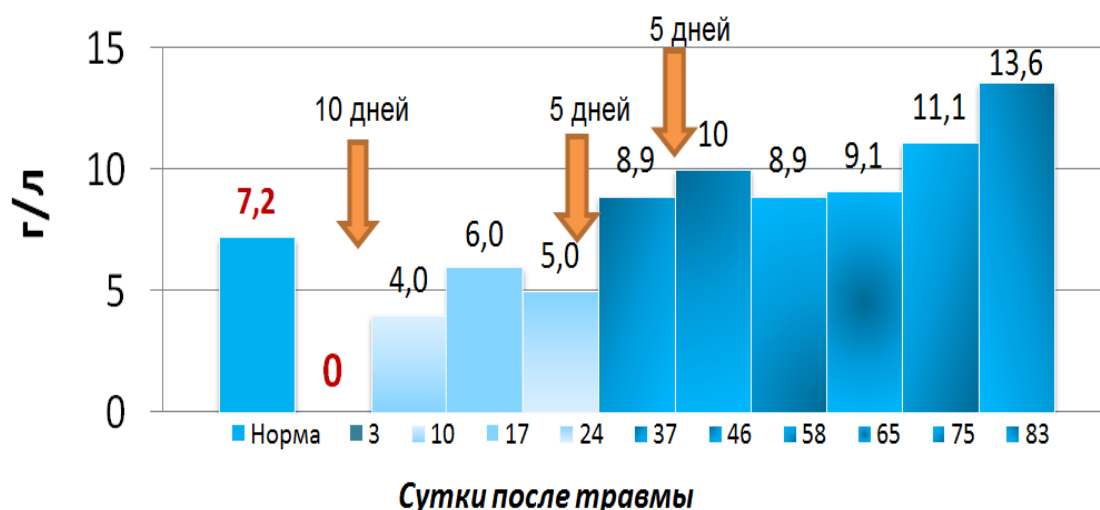


Рис. 3.9. Динамика уровня IgG пациентки Н. на фоне комплексного лечения и иммунозаместительной терапии: 3 курса ВВИГ -Габриглобин по 50 мл/сут (обозначено стрелками)

Таблица 3.4. Этапное хирургическое лечение пациентки Н.

№	Дата	Операция
1	06.12.09	Декомпрессионная некрэктомия ожогового струпа на верхних конечностях.
2	02.01.10	Хирургическая некрэктомия ожогового струпа на верхних и нижних конечностях 25%п.т.
3	11.01.10.	Хирургическая обработка и аутодермопластика гранулирующих ран верхних конечностей 10%п.т.
4	21.01.10	Хирургическая некрэктомия ожогового струпа на обоих бедрах 4%п.т. с УЗ-кавитацией гранулирующих ран верхних и нижних конечностей. Аутодермопластика гранулирующих ран обоих бедер 10%п.т. Ксенопластика.
5	02.02.10	Хирургическая обработка с УЗ-кавитацией гранулирующих ран верхних и правой нижней конечностей 13% п.т. Аутодермопластика гранулирующих ран верхних и правой нижней конечности 13% п.т. Ксенопластика.
6	18.02.10	Ампутация 1-5 пальцев обеих кистей. Хирургическая обработка и аутодермопластика гранулирующих ран туловища, левого бедра 15% п.т.
7	17.03.10	Хирургическая обработка и аутодермопластика гранулирующих ран туловища, верхних и нижних конечностей 5% п.т.

На первых этапах хирургического лечения, с целью предотвращения ишемии подлежащих тканей и уменьшения интоксикации организма больной выполнялись декомпрессионная и этапные некрэктомии ожогового струпа (рис. 3.10), а также курсы ультразвуковой обработки гранулирующих ран (рис. 3.11).



Рис. 3.10. Хирургическая некрэктомия ожоговых ран, 29 сутки после травмы



Рис. 3.11. Ультразвуковая обработка ожоговых ран нижних конечностей

В дальнейшем, учитывая наличие обширных ожоговых ран, во многом определяющих тяжесть состояния, больной выполнялись операции по их пластическому закрытию (рис. 3.12).

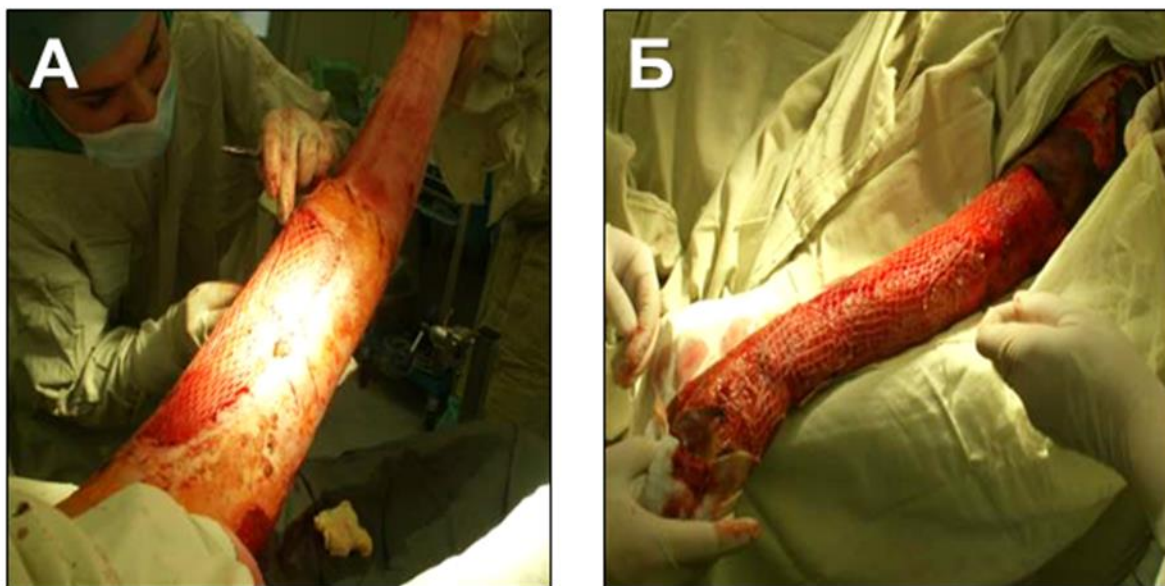


Рис. 3.12. Аутодермопластика гранулирующих ран в области нижних (А) и верхних (Б) конечностей расщепленным перфорированным 1:4 аутодермотрансплантатом

В послеоперационном периоде на фоне продолжающейся комплексной интенсивной терапии и иммунокоррекции состояние больной тяжелое, стабильное с положительной динамикой, пересаженные аутодермотрансплантаты на большей площади прижили. На 68 сутки после травмы больная экстубирована, переведена на самостоятельное дыхание. На фоне комплексного лечения уровень иммуноглобулина IgG нормализовался и сохранялся в дальнейшем на уровне здоровых лиц (см. рис. 3.9). Больной успешно выполнены следующие этапы оперативного лечения по пластическому закрытию обширных ожоговых ран. Осложнений в послеоперационном периоде не было. Пересаженные аутодермотрансплантаты полностью прижили и эпителизировались. Пациентка активизирована, в удовлетворительном состоянии выписана для продолжения реабилитации в амбулаторных условиях (рис. 3.13).



Рис. 3.13. Перед выпиской, 143 день после травмы

Успешное комплексное лечение пациентки коррелировало с положительными изменениями показателей иммунного статуса. Перед выпиской пациентки в иммунном статусе, в сравнении с анализом при поступлении, отмечается значительное снижение гипервоспалительной реакции с нормализацией индекса эндогенной интоксикации ЛИИ, сдвига формулы крови и кислородного метаболизма фагоцитов при сохранении незначительного повышения нейтрофилов с экспрессией активационных маркеров $CD64^{+}$ и $CD 70^{+}$ (рис. 3.14).

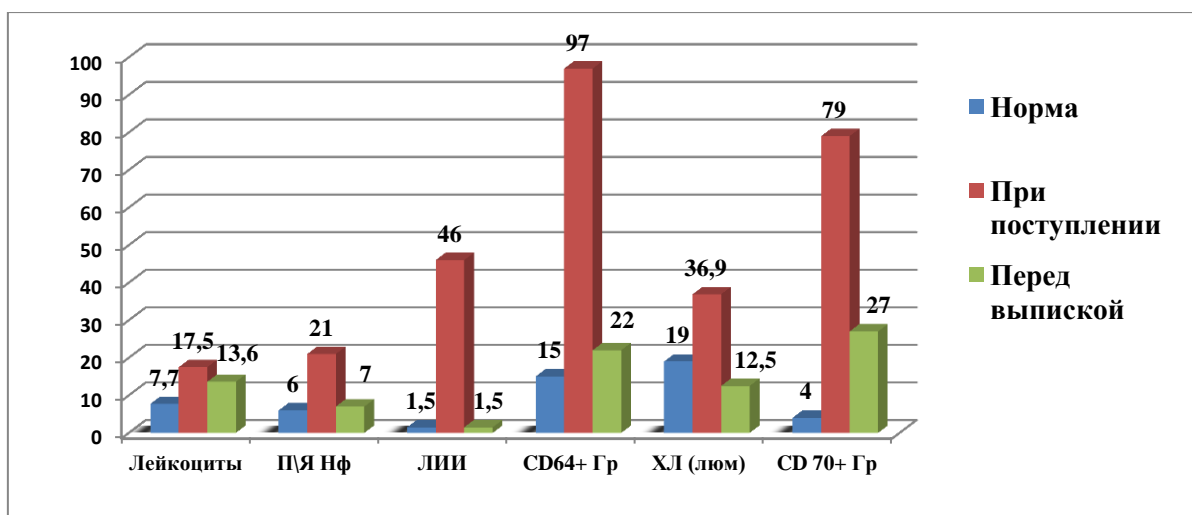


Рис. 3.14. Иммунные маркеры воспалительной реакции пациентки Н. при поступлении и перед выпиской из Ожогового центра

Как видно из рисунка 3.15, также произошло полное восстановление глубокого дефицита показателей лимфоидного иммунного звена, в том числе клеточного компонента гуморального иммунитета на уровне В-лимфоцитов с нормализацией HLA-DR⁺ моноцитов.

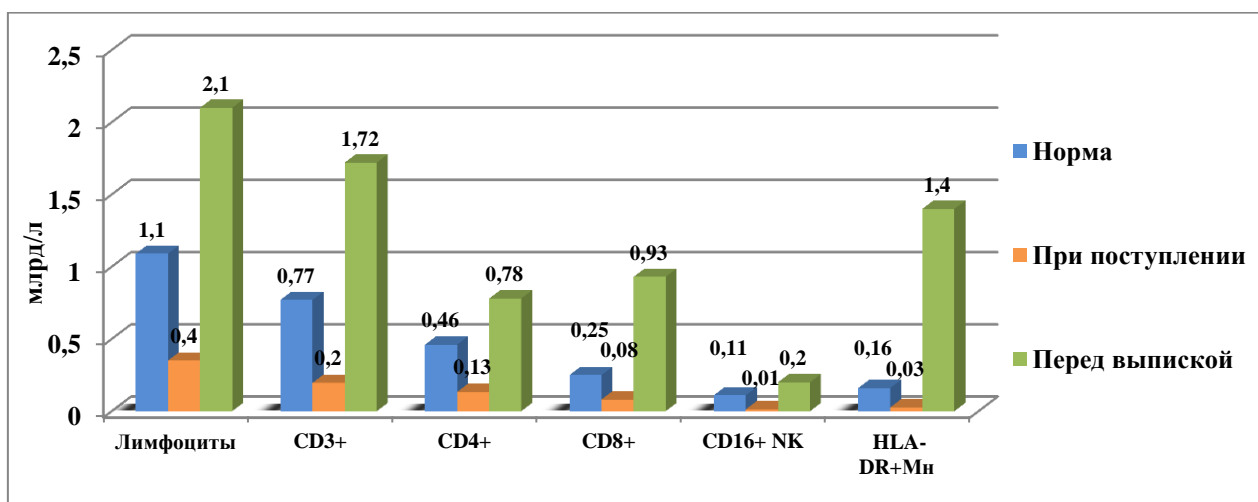


Рис. 3.15. Показатели клеточного иммунного звена пациентки Н. при поступлении и перед выпиской из Ожогового центра

Таким образом, позитивные изменения иммунного статуса можно рассматривать как компенсаторные, связанные со снижением активности инфекционно-воспалительного процесса, регресса сепсиса и периодом реконвалесценции ожоговой болезни на фоне восстановления целостности кожного покрова.

Глава 4. ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ СЕПТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Полученные результаты явились основой разработки инновационных подходов в иммунодиагностике сепсиса у обожженных и для определения объема и тактики комплексного лечения и системной иммунокоррекции на измененные параметры иммунной системы, что особенно важно для успешного лечения тяжелообожженных.

4.1. Клиническая характеристика больных с септическими осложнениями ожоговой болезни

Всего обследовано иммунологически 85 ожоговых больных, среди которых основную группу составили 45 человек с септическими осложнениями. В группу сравнения включили 40 пациентов с ожогами, у которых на протяжении всего пребывания в Ожоговом центре сепсиса не было.

Общие характеристики ожоговых больных и количественное распределение по возрасту и площади поражения представлены в таблице 4.1.

Результаты свидетельствуют, что распределение по возрасту в группах пациентов не различалось, однако по площади ожогового поражения основная группа больных с септическим осложнением была более тяжелой – в 84,4% случаях против 52,5% пациентов группы сравнения общая площадь ожогов составила >30% поверхности тела.

Таблица 4.1. Общая характеристика ожоговых больных

Распределение пациентов	Основная группа (с сепсисом), n (%)		Группа сравнения (без сепсиса), n (%)	
Количество пациентов, n	45 (100)		40 (100)	
Возраст, лет				
18-30	13 (28,9)		11 (27,5)	
31-50	22 (48,9)		20 (50,0)	
51-73	10 (22,2)		9 (22,5)	
Общая площадь ожогов, %				
10-29	7 (15,6)		19 (47,5)	
30-50	25 (55,6)	38 (84,4)	16 (40,0)	21 (52,5)
>50	13 (28,9)		5 (12,5)	

4.2. Иммунный статус больных с септическими осложнениями ожоговой болезни

Дефицит общих лимфоцитов $< 5,0$ % выявлен у 28,9 % больных основной группы с ожоговым сепсисом, тогда как в группе сравнения (без сепсиса), указанный уровень лимфоцитов встречался лишь у 2,5 % больных. Используя диапазон относительного количества лимфоцитов в пределах 5,0% - 9,3% количество больных с этим показателем увеличивается уже до 40% в группе септических больных и 20% в группе больных без сепсиса [18] (рис. 4.1).

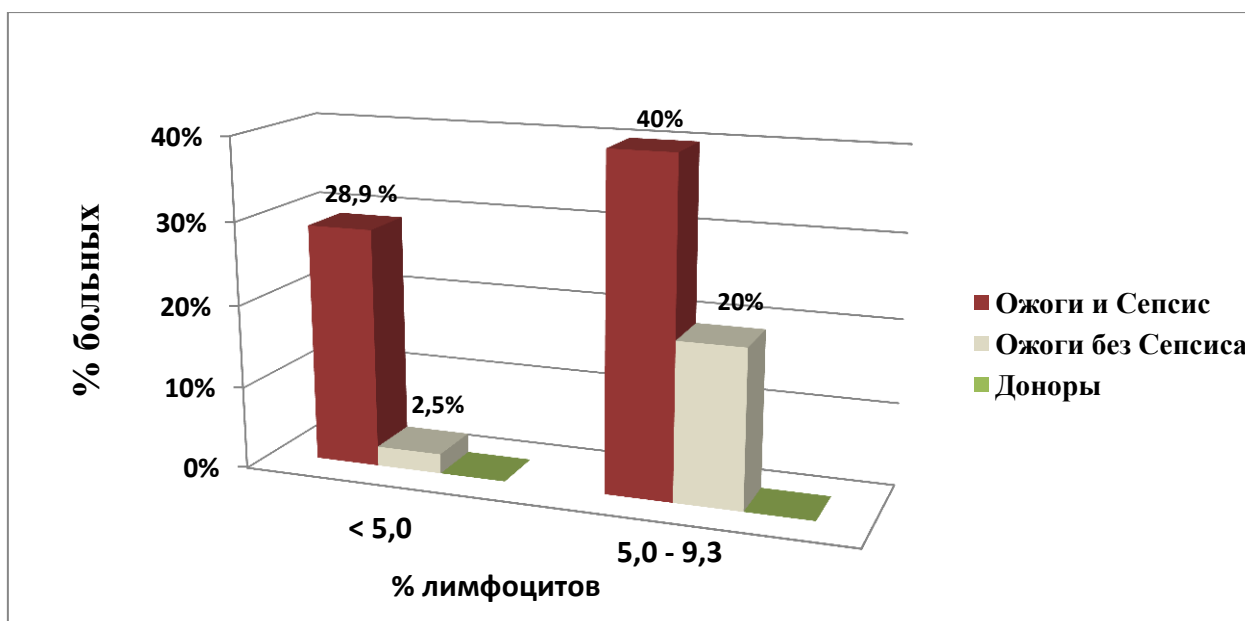


Рис. 4.1. Относительное содержание общих лимфоцитов в различных группах ожоговых больных

При использовании более общего диапазона содержания лимфоцитов $<9,3\%$ группа больных сепсисом возрастает до $66,7\%$, а группа пациентов с ожогами, но без сепсиса до 20% (рис. 4.2.). Т.е. при лимфопении $<5\%$ количество пациентов с сепсисом оказывается в $11,6$ раз больше, чем без него, а при диапазоне лимфоцитов от $5,0 - 9,3\%$ - в $2,0$ раза, тогда как в случае содержания лимфоцитов $<9,3\%$ разница составляет $3,3$ раза соответственно. Таким образом, **содержание лимфоцитов $<9,3\%$** ($\chi^2 = 18,44$, $P < 0,001$) позволяет определить этот показатель как один из составляющих критериев диагностического алгоритма прогноза развития сепсиса [18].

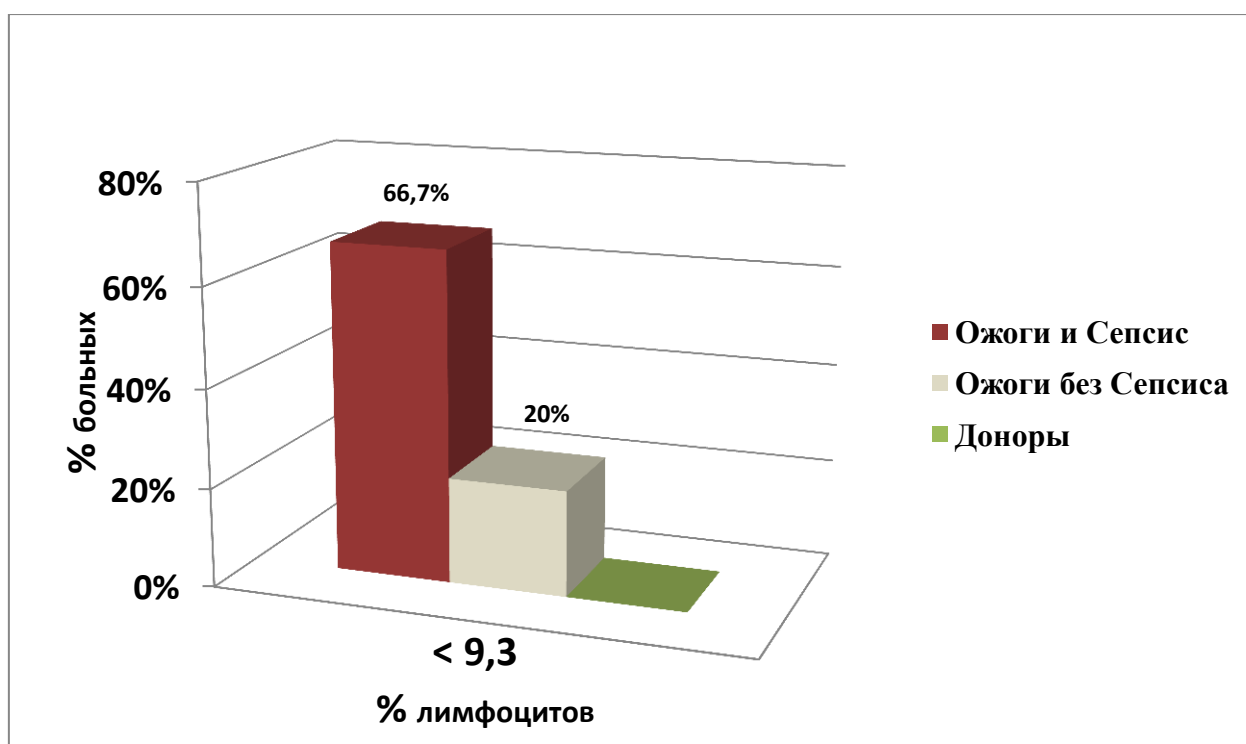


Рис. 4.2. Относительное содержание общих лимфоцитов в различных группах ожоговых больных

Четкие данные получены и по содержанию естественных киллеров (NK-клеток) у ожоговых больных (рис. 4.3). Дефицит естественных киллеров <3,0 % отмечен у 33,3 % больных с ожоговым сепсисом и лишь у 2,5% пациентов без сепсиса. Если использовать диапазон с уровнем NK - клеток от 3,0 % до 5,0 %, то количество больных с сепсисом оказывается 37,8 %, без сепсиса – 10 %. Если же использовать содержание естественных киллеров <5,0 %, то септических пациентов с таким количеством клеток окажется 71,1%, а без сепсиса - лишь 15% (рис. 4.4). Дефицит естественных киллеров в этих трех случаях будет у значительно большего числа больных с сепсисом в сравнении с ожоговыми пациентами без сепсиса - соответственно в 13,2; 3,7 и в 4,7 раза. Таким образом, прогноз развития сепсиса оказывается возможным при содержании естественных киллеров NK <5,0% ($\chi^2=26,65$, $P < 0,001$) [18].

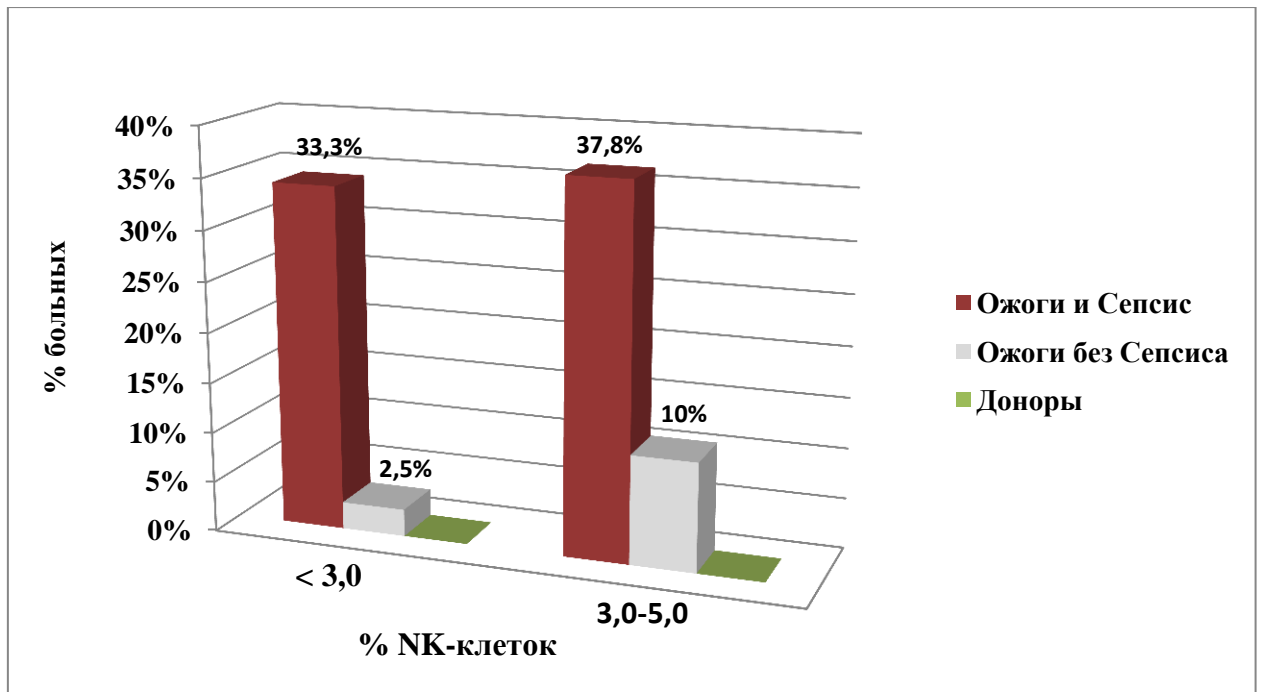


Рис. 4.3. Относительное содержание естественных киллеров (NK-клеток) в различных группах ожоговых больных

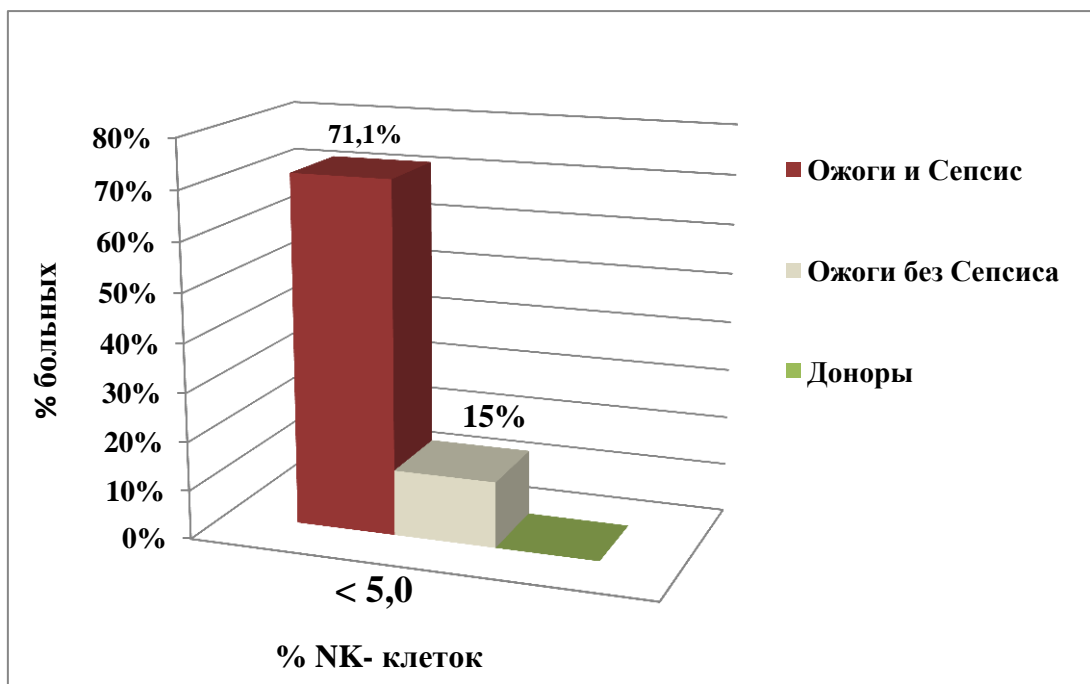


Рис. 4.4. Относительное содержание естественных киллеров (NK-клеток) в различных группах ожоговых больных

Уровень иммуноглобулина IgG является высоко информативным в диагностике сепсиса у ожоговых больных (рис. 4.5).

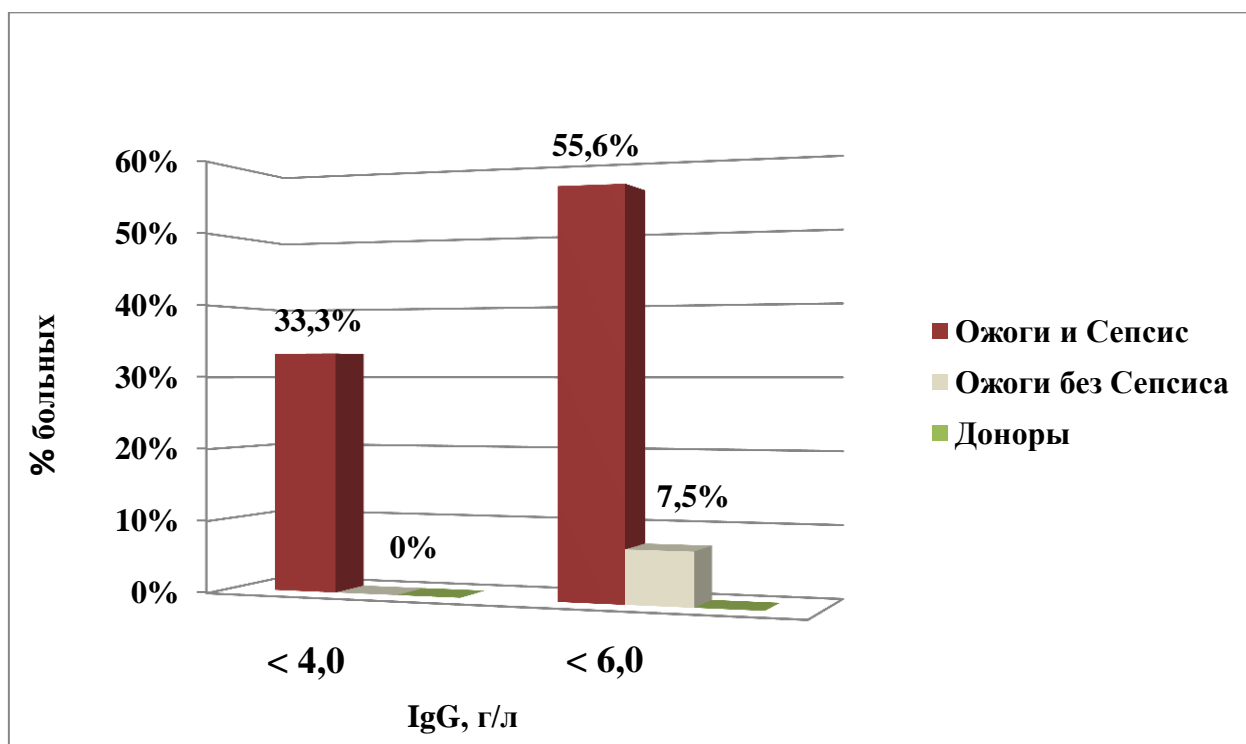


Рис. 4.5. Содержание иммуноглобулина IgG в крови ожоговых больных

Недостаточная концентрация в сыворотке крови IgG <4,0 г/л отмечалась у 33,3% пациентов из группы с септическими осложнениями, тогда как среди обожженных пациентов без сепсиса указанного дефицита IgG не было ни в одном случае. Вместе с тем, количество ожоговых больных с сепсисом с содержанием IgG <6,0 г/л оказалось в 7,4 раз больше в сравнении с группой больных без сепсиса – 55,6% и 7,5% соответственно. Таким образом, **при уровне иммуноглобулина IgG <6,0 г/л ($\chi^2 = 20,39$, $P < 0,001$)** имеется очень высокая вероятность развития сепсиса, которая еще более возрастает при дефиците IgG <4,0 г/л ($\chi^2 = 15,1$, $P < 0,001$). Как было показано ранее, при тяжелом течении ожоговой болезни, при глубоких ожогах, термоингаляционной травме, психологическом стрессе, нередко в циркуляции полностью отсутствовал иммуноглобулин IgG в случаях развития септического осложнения [18].

Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) достоверно отражает развитие эндогенной интоксикации, в том числе с наличием бактериального компонента (рис. 4.6).

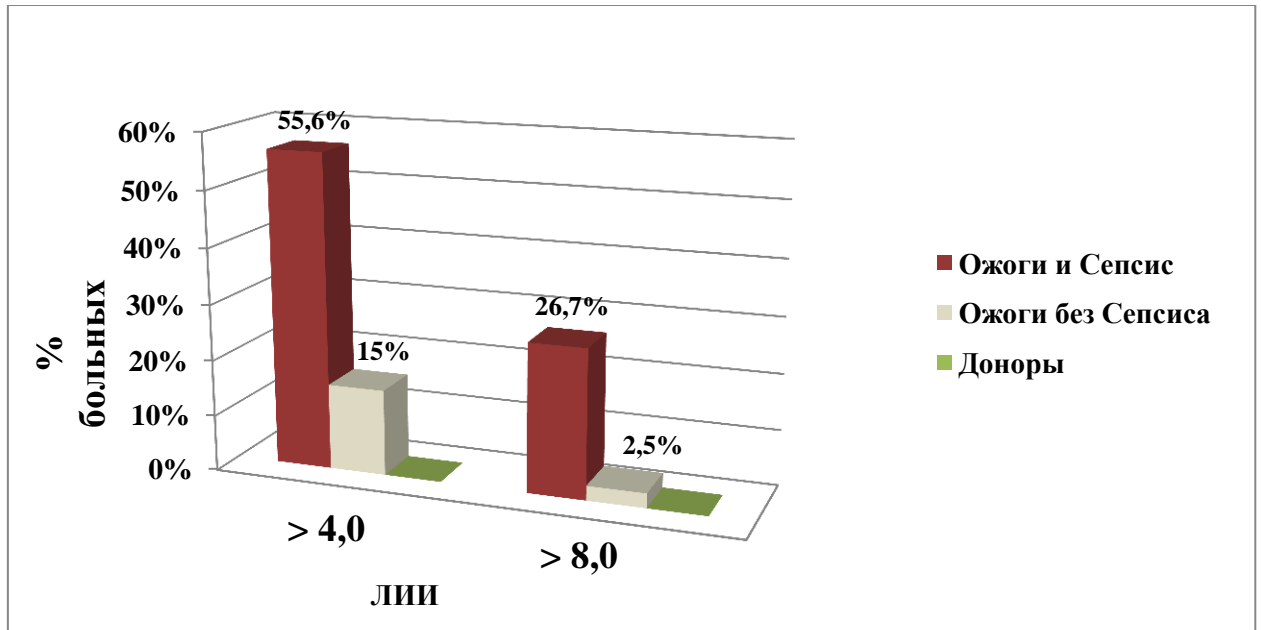


Рис. 4.6. Уровень эндогенной интоксикации по индексу ЛИИ у ожоговых больных

Значение ЛИИ >4,0 ЕД отмечалось у 55,6% пациентов с ожоговым сепсисом – это в 3,7 раза больше, чем при ожогах без развития сепсиса - в 15% наблюдений. При возрастании ЛИИ >8,0 отражающего фазу развития декомпенсации эндогенной интоксикации, процент больных составил соответственно 26,7% и 2,5% (разница в 10,7 раз). Таким образом, для прогноза сепсиса **значение ЛИИ >4,0** оказывается достоверно значимым ($\chi^2=14,86$, $P < 0,001$), а при значениях ЛИИ > 8,0 вероятность развития сепсиса еще более возрастает ($\chi^2= 8,23$, $P < 0,002$) [18].

Дефицит HLA-DR+ моноцитов отражает степень выраженности воспалительного процесса и является показательным, так как при развитии сепсиса данный маркер снижается у существенно большего числа пациентов (рис. 4.7).

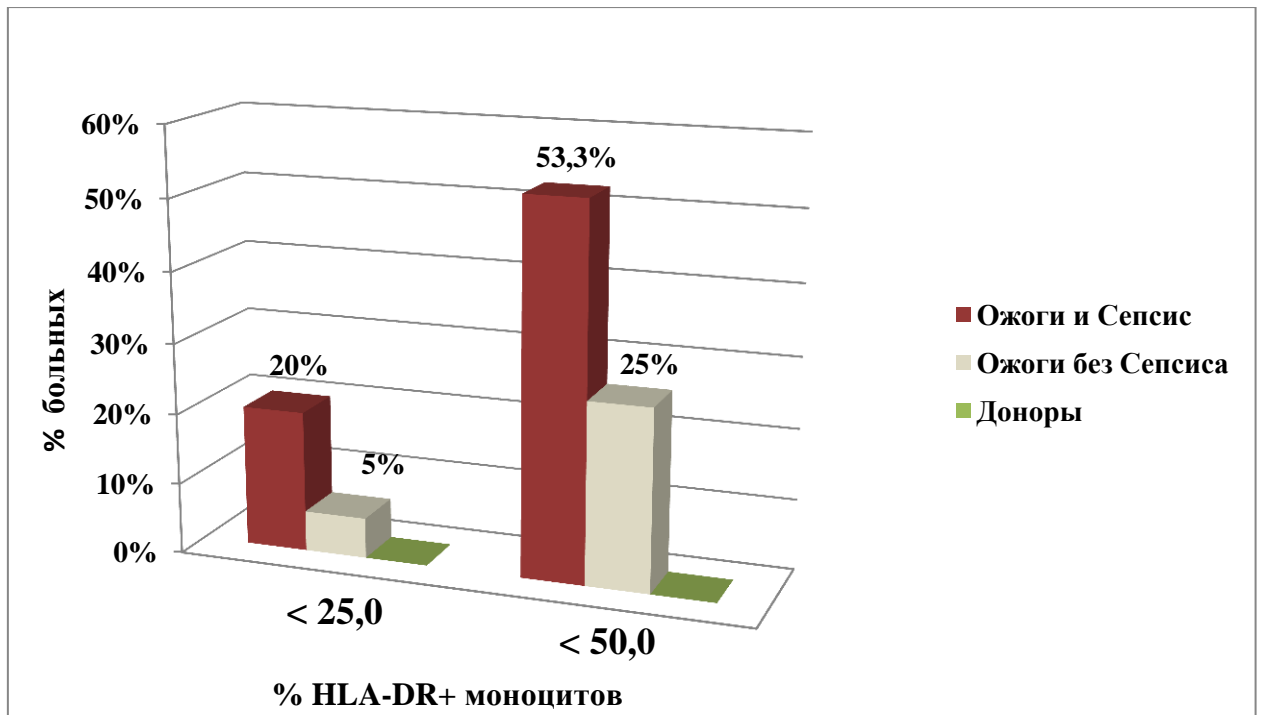


Рис. 4.7. Относительное содержание HLA-DR+ моноцитов в различных группах ожоговых больных

Снижение относительного количества HLA-DR+ моноцитов <25,0 % регистрировалось у 20% больных с ожоговым сепсисом в сравнении с 5% пациентов без сепсиса (разница в 4 раза), а снижение HLA-DR+ моноцитов <50,0 % отмечено уже у 53,3% и 25% указанных выше групп соответственно (разница в 2,1 раза).

Следовательно, **содержание HLA-DR+ моноцитов <50,0 %** может быть использовано в диагностике сепсиса ($\chi^2 = 7,0$, $P < 0,01$) [18].

Палочкоядерные нейтрофилы очень рано и значительно возрастают при развитии воспалительных процессов, в том числе и ожогах. Выраженность такого возрастания может быть использована в диагностике сепсиса у ожоговых пациентов (рис. 4.8).

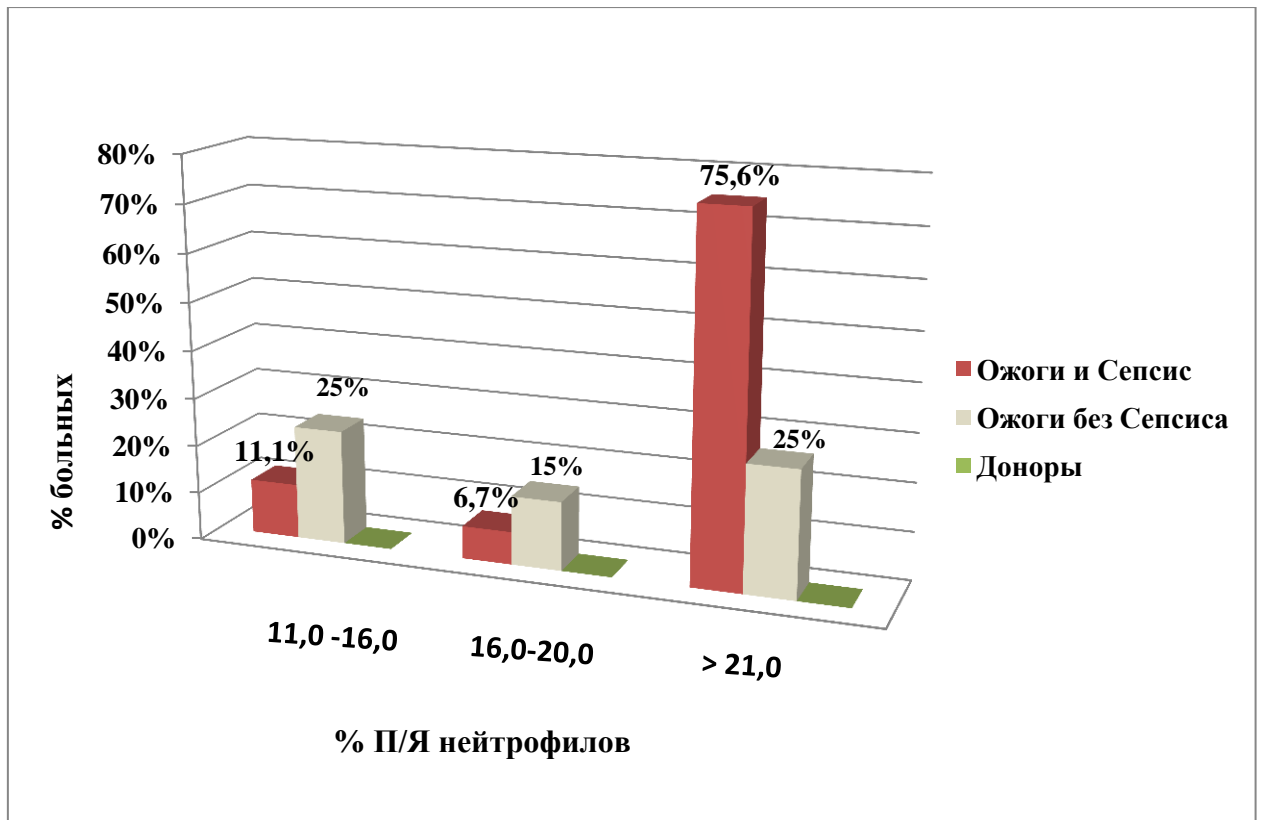


Рис. 4.8. Относительное содержание палочкоядерных нейтрофилов в различных группах ожоговых больных

Ранжирование групп пациентов по различным диапазонам относительных значений П\Я нейтрофилов свидетельствует, что при уровне П\Я нейтрофилов $>21,0$ % число больных в группе с сепсисом резко возрастает до 75,6% против 25% случаев в группе без сепсиса и оказывается достоверным (разница в 3,02 раза). Следовательно, критерий повышения **П\Я нейтрофилов $>21,0$ %** ($\chi^2 = 26,91$, $P < 0,001$) с высокой степенью вероятности может использоваться в диагностике сепсиса у ожоговых больных [18].

Экспрессия высокоаффинного Fc_γ -рецептора гранулоцитов ($CD64^+$) отражает состояние активации данного типа клеток. При развитии различных типов воспаления и инфекций содержание $CD64^+$ гранулоцитов быстро повышается, в том числе, как нами было обнаружено, и при ожогах. Вместе с тем, при присоединении септического осложнения наблюдается резкое его возрастание, нередко до критического уровня $> 90,0$ % (при норме $< 15,0$ %). Данный факт является основополагающим для использования маркера $CD64^+$

гранулоцитов в диагностике сепсиса, т.к. он показателен как «септический» маркер при очень высоких относительных числах **CD 64⁺ 90-100%** ($\chi^2 = 7,0$, **P<0,01**). Подобное содержание гранулоцитов отмечается у 73,3% пациентов с септическим осложнением ожоговой болезни и у 32,5% обожженных больных без сепсиса [18] (рис. 4.9).

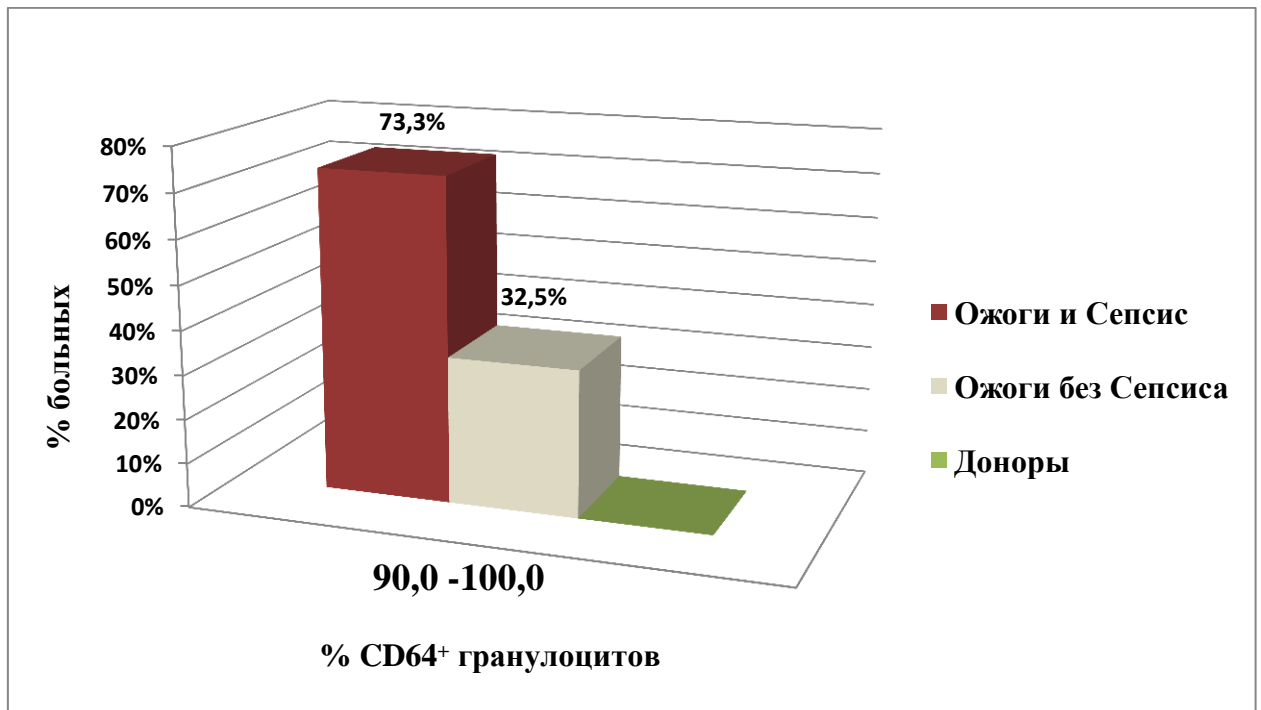


Рис. 4.9. Относительное содержание гранулоцитов с экспрессией высокоаффинного Fc γ -рецептора (CD64⁺) в различных группах ожоговых больных

Оксидативный стресс очень часто развивается при воспалительных процессах, и, как оказалось, при ожоговых травмах. Причем, как показано на рисунке 4.10 среднее значение хемилюминесценции фагоцитов у пациентов с сепсисом существенно превышает показатели здоровых доноров.

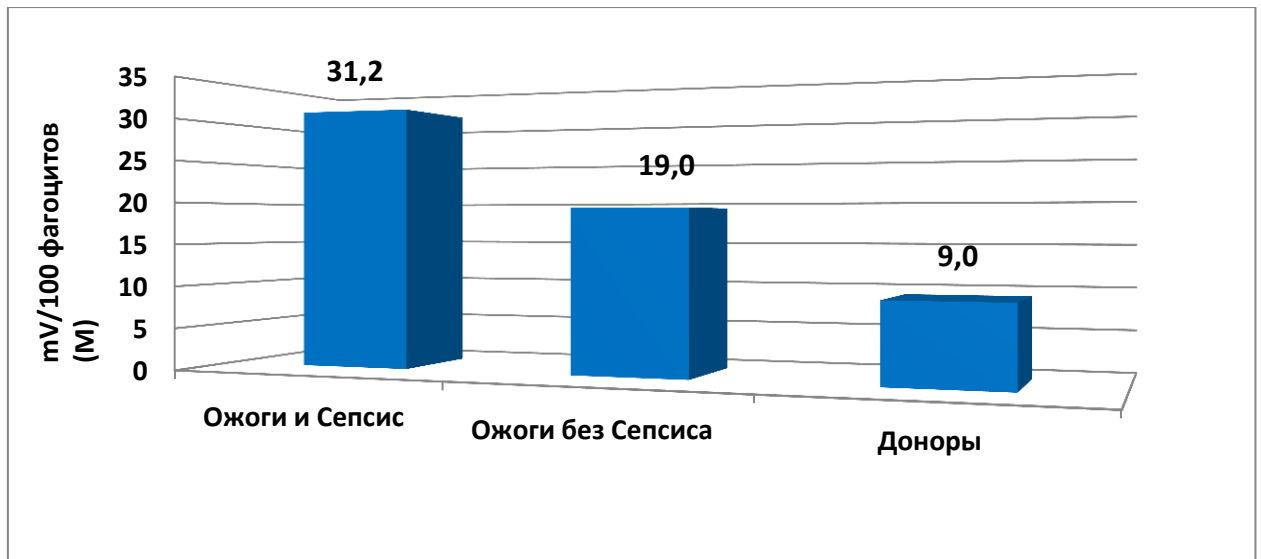


Рис. 4.10. Средние показатели хемилюминесценции фагоцитов у ожоговых больных с сепсисом, без сепсиса и здоровых доноров

Значительные различия отмечались и при достижении максимальной хемилюминесценции - у больных с септическим осложнением она составляла 308,0 mV/100 фагоцитов – это в 4,7 раза выше, чем у больных с ожогами без сепсиса и в 19,25 раз выше при сравнении с верхней границей нормы у здоровых доноров (рис. 4.11).

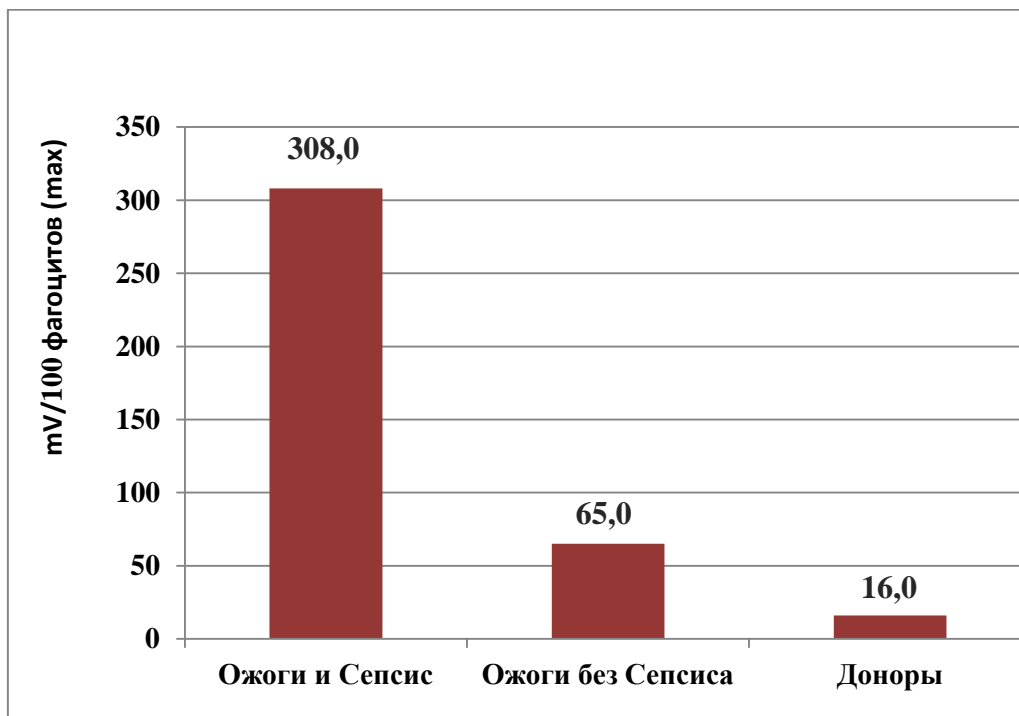


Рис. 4.11. Максимальные показатели хемилюминесценции фагоцитов у ожоговых больных с сепсисом, без сепсиса и здоровых доноров

Кроме того, интенсивность хемилюминесценции оказалась, пропорциональной площади ожогов у больных (рис. 4.12).

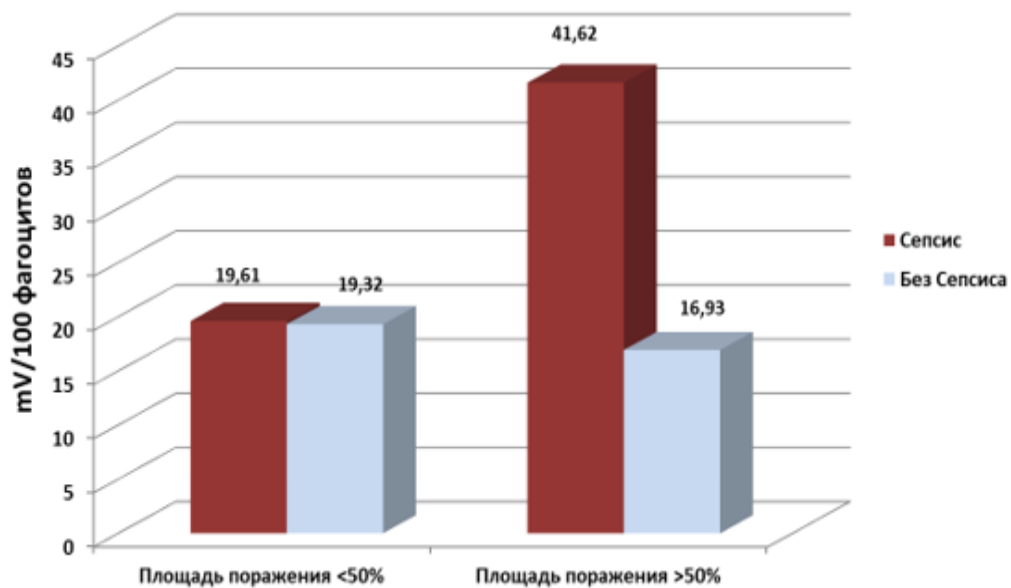


Рис. 4.12. Показатели хемилюминесценции у больных с ожогами различных групп в зависимости от площади поражения

Так, у пациентов с сепсисом с общей площадью ожогов <50,0 % п.т. среднее значение хемилюминесценции составило 19,61 mV/100 фаг, что соответствует норме, тогда как у больных с площадью поражения >50,0% п.т. оно повысилось до 41,62 mV/100 фаг, что в 2,5 раза превышает норму. В то же время, у пациентов с неосложненной ожоговой болезнью хемилюминесценция регистрировалась в пределах нормы даже при обширной площади поражения. Таким образом, хемилюминесценция кислородного метаболизма фагоцитов, не являясь ключевым маркером сепсиса при ожогах, позволяет дополнить панель маркеров диагностики и прогноза сепсиса [18].

Аналогична информативность лейкоцитарной реакции, поскольку хорошо известно развитие лейкоцитоза при любых воспалительно-деструктивных процессах, ожогах, хирургических и других травмах, инфекциях и т.д. Однако исследование в динамике уровня лейкоцитоза

является самым первым и доступным в комплексе дополнительных мероприятий при лечении ожоговой болезни.

Так, при содержании лейкоцитов в пределах 10,6 – 18,0 млрд/л существенной разницы между частотой сепсиса у пациентов с обширными ожогами не выявляется. При повышении лейкоцитоза >18,0 млрд/л частота септических осложнений значимо возросла - в 8,9 раза (рис. 4.13). Однако известно, что при истощении организма на фоне обширных ожогов септическое осложнение может протекать не только на уровне нормального содержания лейкоцитов, но и даже при лейкопении. Таким образом, вместе с другими маркерами высокий лейкоцитоз также может быть дополнительным критерием сепсиса [18].

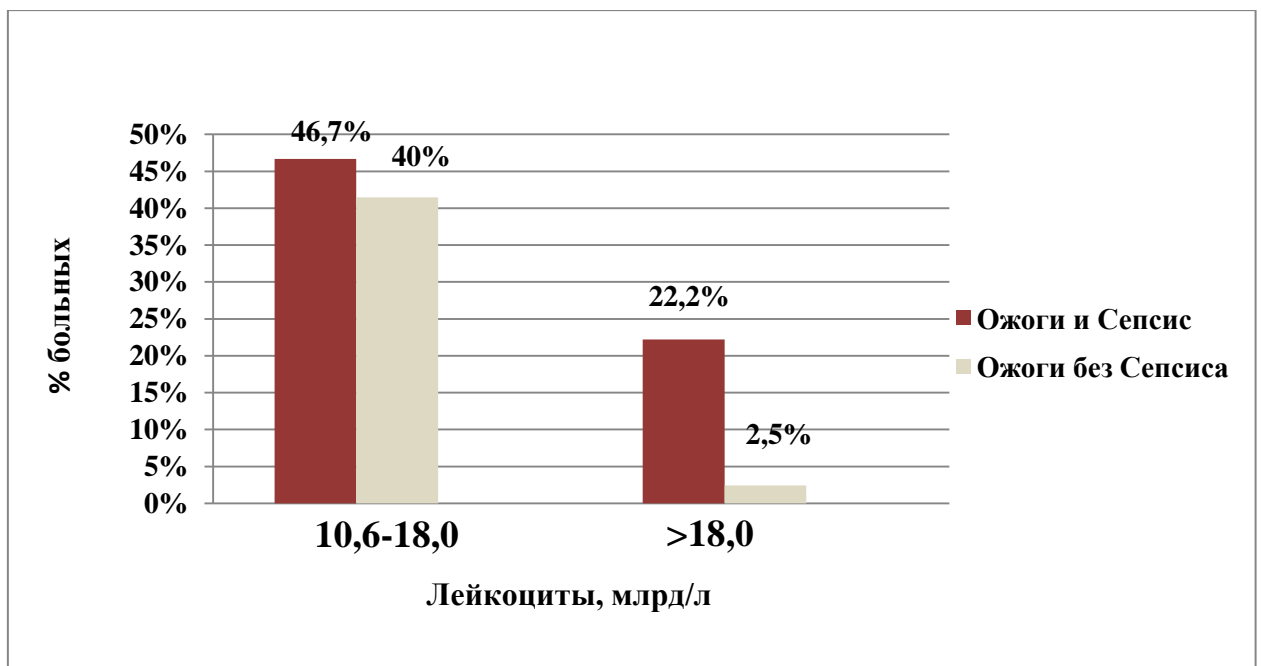


Рис. 4.13. Число ожоговых больных в группах с сепсисом и без сепсиса относительно уровня лейкоцитов

Сводные результаты по ключевым статистически значимым иммунным маркерам у ожоговых больных с сепсисом и без сепсиса приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Статистическая значимость иммунных маркеров у ожоговых больных с сепсисом и без сепсиса

Иммунный маркер	Норма	Уровень маркера	Сепсис, % больных	Без сепсиса, % больных	χ^2	<i>P</i>
Лимфоциты, %	14,0-38,0	< 9,3	66,7	20,0	18,44	< 0,001
Естественные киллеры (NK -клетки), %	6,47-17,8	<5,0	71,1	15,0	26,65	< 0,001
HLA-DR+ моноциты, %	60,2-95,0	< 50,0	53,3	25,0	7,0	< 0,001
Ig G, г/л	7,2-16,4	< 6,0	55,6	7,5	20,39	< 0,001
Палочко-ядерные нейтрофилы, %	0-8,5	> 21,0	75,6	25,0	26,91	< 0,001
Лейкоцитарный индекс интоксикации, У.Е.	< 1,5	> 4,0	55,6	15,0	14,86	< 0,001
CD 64⁺ гранулоциты, %	0,75-15,0	90-100	73,3	32,5	14,05	< 0,001

4.3. Иммунная экспресс-диагностика сепсиса у больных с ожогами

Общая картина ранней иммунной диагностики сепсиса при ожогах по анализу статистически значимых отклонений иммунных показателей по классификации степеней стимуляции (СИС) и недостаточности (СИН) иммунной системы (А.М. Земсков и др., 1997) представлена на рисунках 4.14. и 4.15.

Получено 5 высокодостоверных иммунных маркеров (рис. 4.14) для прогнозирования и диагностики септического осложнения ожогов - дефицит общих лимфоцитов, естественных киллеров, HLA-DR+ моноцитов, иммуноглобулина G и гиперактивация индекса эндогенной интоксикации ЛИИ.

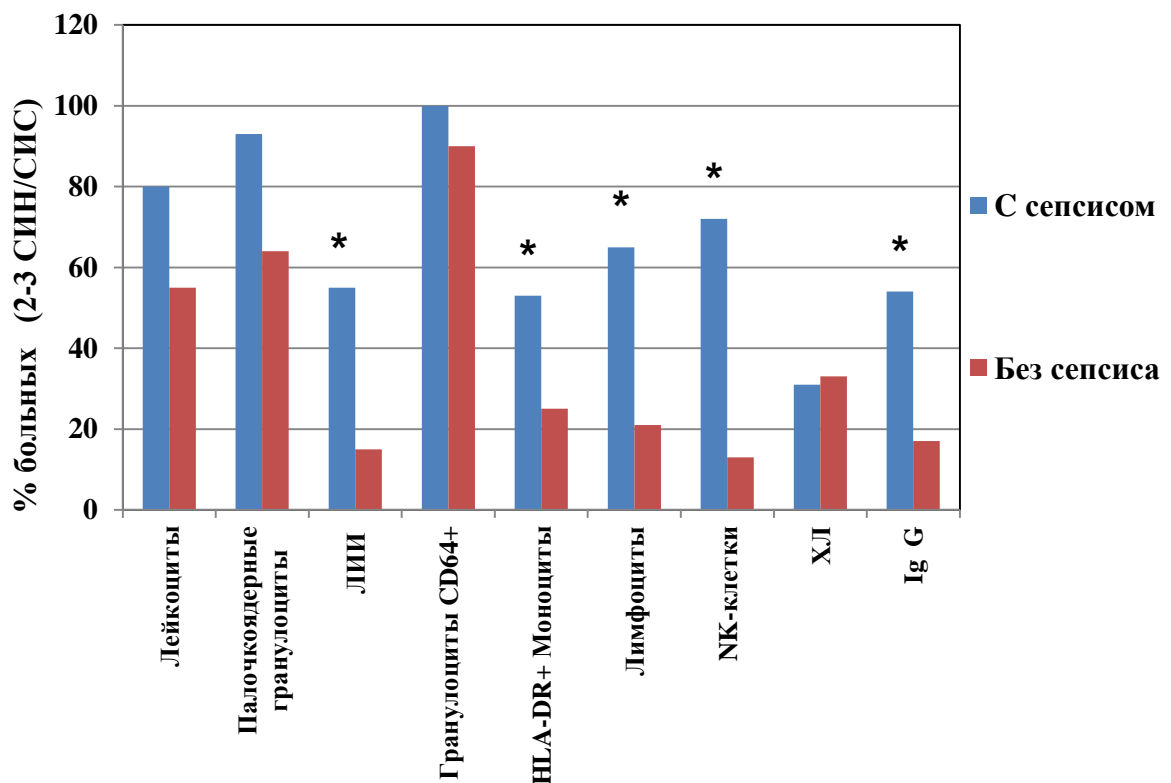


Рис. 4.14. Встречаемость статистически значимых отклонений (*) иммунных показателей у групп ожоговых больных с сепсисом и без сепсиса

В то же время, если ввести определенные числовые ограничения и на другие иммунные показатели и расширить анализ, то панель маркеров для диагноза сепсиса включает 7 составляющих (рис. 4.15) – дефицит общих лимфоцитов, естественных киллеров, HLA-DR⁺ моноцитов, иммуноглобулин G и возрастание CD64⁺ гранулоцитов, палочкоядерных нейтрофилов и ЛИИ [18].

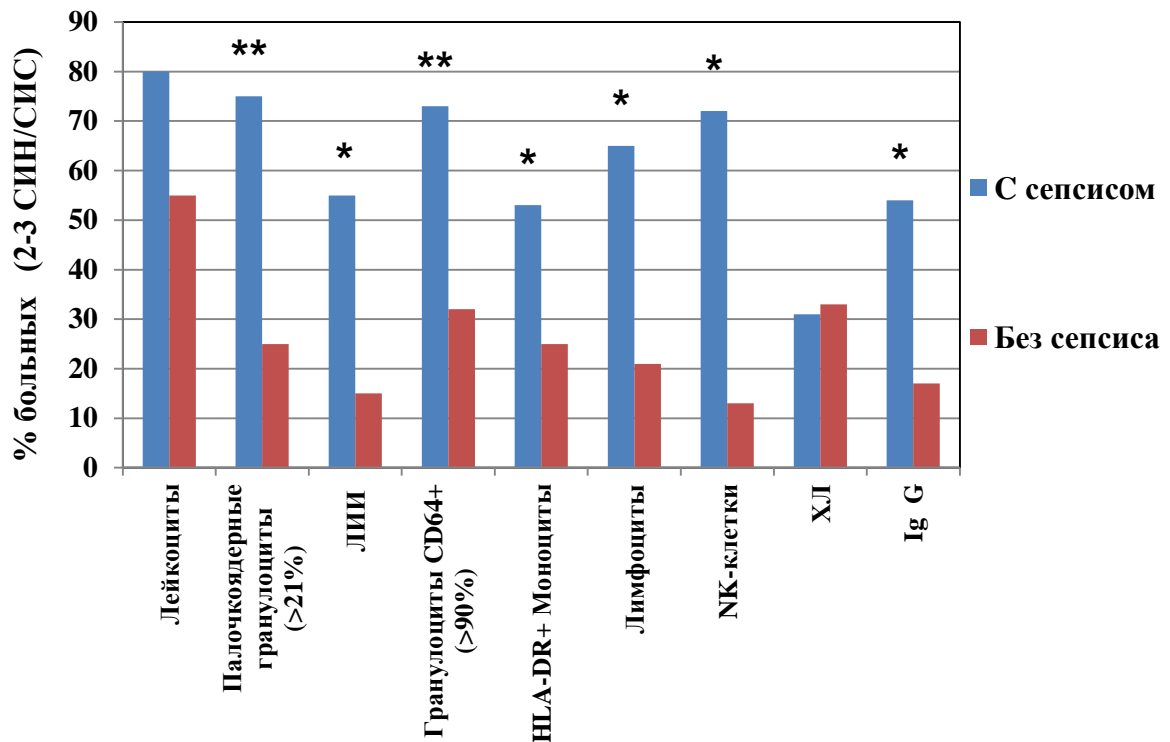


Рис. 4.15. Встречаемость статистически значимых отклонений (*) иммунных показателей с дополнительными ограничениями (**) у групп ожоговых больных с сепсисом и без сепсиса

Важно, что одиночные показатели иммунного статуса не позволяют четко диагностировать развитие сепсиса при ожогах, а достоверно работают только в совокупности [18].

Впервые в мировой практике на основе комплекса проведенных иммунодиагностических исследований у больных с ожогами разработана формула иммунной диагностики сепсиса, включающая конкретные числовые значения мультиплексной панели иммунных маркеров:

Лимфоциты < 9,3 %
Естественные киллеры (NK) < 5 %
HLA-DR+ моноциты < 50 %
Иммуноглобулин IgG < 6,0 г\л
Палочко-ядерные нейтрофилы > 21 %
Индекс эндогенной интоксикации ЛИИ > 4,0 ЕД
CD64+ гранулоциты 90 - 100 %

Для определения «специфичности» и «чувствительности» иммунной панели у ожоговых больных в прогнозировании септических осложнений у 36 больных определяли совпадение клинического диагноза сепсиса с числовой формулой прогноза сепсиса по срокам постановки иммунного диагноза сепсиса: до клинического, одновременно с выставлением клинического диагноза и через сутки после установления клинического диагноза сепсиса. Фактически нами решался вопрос прогнозирования развития септических осложнений ожоговой болезни с помощью иммунодиагностических подходов [18].

Таблица 4.3. Прогноз развития сепсиса. Совпадение клинического и иммунного диагноза сепсиса

Иммунный диагноз сепсиса до клинического (число больных)		Иммунный диагноз сепсиса одновременно с клиническим (число больных)	Иммунный диагноз сепсиса после клинического (1 сутки) (число больных)
N=24		N=7	N=5
Число больных	Прогноз (сутки)		
4	1		
4	2		
8	3		
2	4		
1	5		
2	6		
1	7		
1	13		
1	15		
Суммарный прогноз			
8 (33,33%)	1 - 2		
10 (41,67%)	3 - 4		
4 (16,67%)	5 - 7		
2 (8,33%)	~ 2 недель		

Из таблицы 4.3 видно, что у 24 ожоговых больных по формуле прогноза сепсиса предварительно был поставлен иммунный диагноз сепсиса до установления клинического диагноза. У 33,33% больных он был выставлен за 1-2 суток до постановки клинического диагноза сепсиса, у 41,7% за 3-4 суток, у 16,7% за 4-6 суток и у двух больных (8,3 %) почти за 2 недели. При постановке клинического диагноза сепсиса он был подтвержден иммунологически у 7 пациентов в тот же день и у 5 - через сутки [18].

Впервые на основании проведенного анализа результатов комплексного иммунного исследования дополнительно с клинико-лабораторными данными, разработана количественная иммунная формула диагностики сепсиса при ожогах, обладающая высокой (до 95%) специфичностью и возможностью раннего прогнозирования развития септических осложнений ожоговой болезни.

Глава 5. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ТЯЖЕЛООБОЖЖЕННЫХ БОЛЬНЫХ НА ЭТАПАХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИММУННОГО СТАТУСА И РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА

На основе изучения инновационного иммунного статуса, включая оценку регенераторного потенциала на клеточном и субклеточном уровне, проведена новая серия клинико-экспериментальных исследований у больных с обширными ожогами по оценке эффективности комплексного лечения и определения тактики этапного хирургического лечения по восстановлению целостности кожного покрова. Активная хирургическая тактика является основой комплексного лечения ожогов. Своевременное удаление некротизированных тканей и восстановление целостности кожного покрова при глубоких ожогах, с использованием современных раневых покрытий и других методов местного консервативного и интенсивного общего лечения принципиально необходимо для профилактики и успешного лечения гнойно-септических осложнений ожоговой болезни.

5.1. Оценка эффективности хирургического лечения пациентов с обширными ожогами на основе исследования иммунного статуса.

Проведен анализ результатов комплексного иммунного статуса (более 13500 исследований) при поступлении у 100 пациентов, из них у 55 больных в динамике на 10-е и 30-е сутки комплексного лечения. Кроме того, обследовали 30 здоровых первичных доноров для определения референсных показателей иммунного статуса и последующего их сравнительного анализа с данными пациентов.

Как правило, пациенты поступали на лечение в отделение ОРИТ в периоде острой ожоговой токсемии или септикотоксемии в среднем на 7-е сутки после травмы из других медицинских учреждений для оказания специализированной, высокотехнологичной помощи. Ожоги в основном

были представлены дезэпителизированными ранами бледно-розового цвета (ожоги II степени), влажным струпом серого цвета (ожоги III степени), с налетом фибрина и участками сформированного струпа коричневого цвета, с наличием слизисто-гнойного отделяемого и перифокальным воспалением, нередко имелись некротомические разрезы до подкожно-жировой клетчатки по наружной поверхности конечностей (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Вид ожоговых ран при поступлении в ожоговый центр.

При первичном обследовании у пациентов в основном отмечался дисбаланс иммунной системы, проявляющийся сдвигом формулы крови влево с появлением юных форм и токсической зернистости нейтрофилов, существенным возрастанием гранулоцитов с экспрессией «септического» маркера $CD64^{+}$ по сравнению с уровнем здоровых доноров: медиана 72,6 [Q₁41,2; Q₃92,6] и 2,5 [Q₁1,2; Q₃5,5] % соответственно, ($p < 0,0001$) (рис. 5.2).

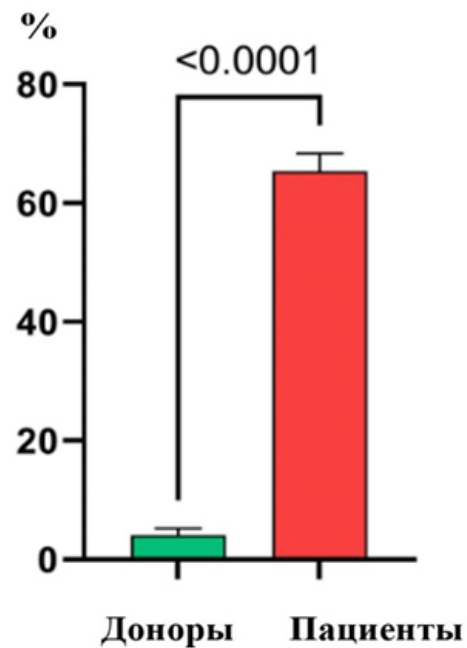
CD64+ гранулоциты

Рис. 5.2. Содержание гранулоцитов (%) с экспрессией CD64⁺ (ось ординат) у тяжелообожженных пациентов при поступлении в Ожоговый центр в сравнении со здоровыми донорами

Одновременно происходило нарушение антигенпрезентации со статистически значимым снижением, относительно доноров, маркера HLA-DR⁺ моноцитов $63,4 \pm 2,5\%$ ($p < 0,0001$), отражающего также степень воспалительного процесса в организме (рис. 5.3).

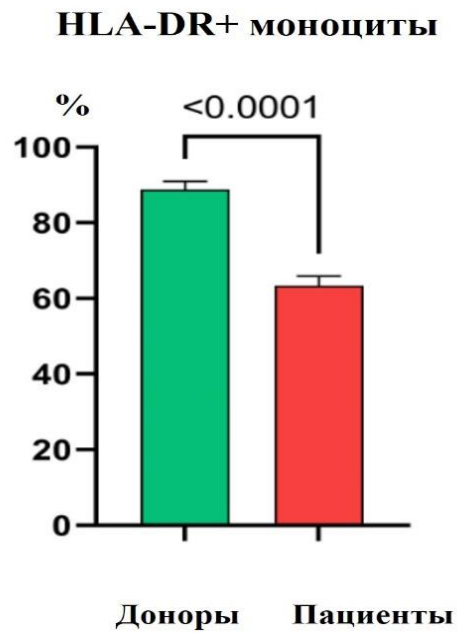


Рис. 5.3. Содержание HLA-DR+ моноцитов (%) (ось ординат) у тяжелообожженных пациентов при поступлении в Ожоговый центр в сравнении со здоровыми донорами

Наиболее выраженные изменения отмечены со стороны гуморального иммунного звена, проявляющиеся достоверным снижением ключевых иммуноглобулинов IgG - $6,62 \pm 0,2$ г/л и IgM $0,88 \pm 0,05$ г/л в сравнении с показателями здоровых лиц, соответственно $9,92 \pm 0,41$ и $1,36 \pm 0,09$ ($p < 0,0001$) (рис. 5.4).

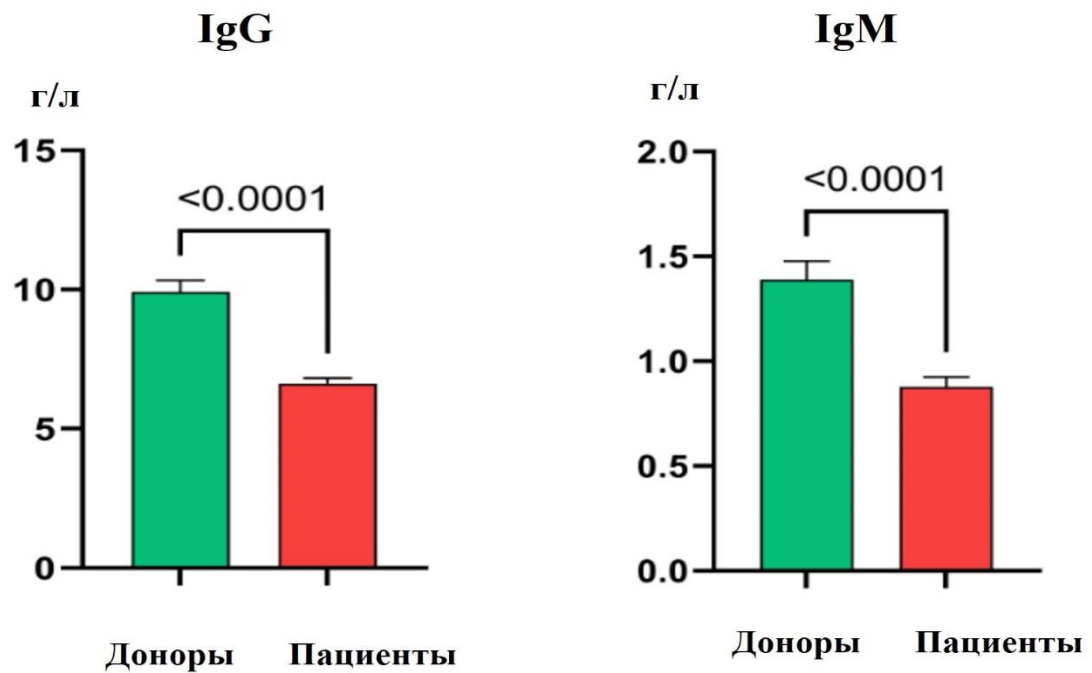


Рис. 5.4. Содержание иммуноглобулинов IgG и IgM (г/л) (ось ординат) у тяжелообожженных пациентов при поступлении в Ожоговый центр в сравнении со здоровыми донорами

В сравнении с группой доноров у пациентов не было выявлено достоверных различий иммунорегуляторного индекса (ИРИ) CD4+/CD8+, отражающего соотношение ключевых субпопуляций Т-клеток (Т-хелперы и Т-цитотоксические лимфоциты). Возможно, это происходило за счет дисбаланса иммунорегуляции Т-клеточного иммунного звена по инфекционному и (или) аутоиммунному типу с разнонаправленными изменениями индекса ИРИ: в сторону снижения ИРИ $<1,0$ у.е. при осложненном течении ожоговой болезни и наличии инвазивной раневой инфекции, или возрастания ИРИ $>3,0$ у.е. при эндогенной интоксикации с аутоиммунным компонентом. Причем, одновременно могли происходить и нарушения цитотоксического киллерного потенциала на уровне дефицита регуляторных и эффекторных субпопуляций естественных киллеров, а также НК Т-лимфоцитов (CD3+CD56+).

На следующем этапе у 55 (основная группа) больных проведен сравнительный анализ результатов изучения иммунного статуса в динамике на разных сроках лечения: (1) при поступлении, (2) на 10-е сутки лечения, (3) на 30-е сутки лечения, в том числе и в сравнении с показателями 30 здоровых доноров (контрольная группа).

Средний возраст больных основной группы составил $44,2 \pm 1,9$ года, общая площадь ожогового поражения - $51,0 \pm 2,0$ п.т., из них глубокие ожоги в среднем достигали $19,1 \pm 2,1$ п.т. Первично иммунный статус у пациентов оценивался при поступлении в Ожоговый центр в среднем на $13,18 \pm 2,45$ сутки после травмы. Результаты представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1. Показатели иммунного статуса здоровых лиц и пациентов с ожогами в различные сроки комплексного лечения, Ме [Q1;Q3]

№	Показатель	Контроль- ная группа, n=30	Основная группа, n=55			Сравни- тельный анализ по значениям <i>P</i> 1/2;1/3;2/3
			Сроки анализа иммунного статуса пациентов, сутки после травмы			
			(1) поступление, 13,18±2,45	(2) 10 сутки лечения, 23,6±2,5	(3) 30 сутки лечения, 40,8±2,9	
1	Лейкоциты, млрд/л	5,89 [5,2; 6,6]	11,60 [8,0; 14,1]*	13,6 [10,0; 16,3]*	10,5 [8,1; 13,3]*	1/2=0,0116 1/3=0,2886 2/3=0,001
2	Нейтрофилы палочкоядерные, %	5,00 [4,4; 6,5]	20,5 [12,5; 29,5]*	16,5 [10,0; 22,5]*	12,5 [7,5; 20,0]*	1/2=0,0227 1/3=0,0009 2/3=0,1757
3	ИСЛК, у.е.	1,6 [1,3; 2,0]	4,3 [3,2; 5,5]*	4,0 [3,0; 5,5]*	2,7 [1,9; 4,4]*	1/2=0,6016 1/3=0,0314 2/3=0,0255
4	ЛИИ, у.е.	0,9 [0,7; 1,3]	3,7 [2,2; 6,1]*	2,3 [1,3; 4,9]*	1,6 [0,8; 2,8]*	1/2=0,6451 1/3=0,0024 2/3=0,0377
5	CD64 ⁺ гранулоциты, %	2,6 [1,2; 5,5]	76,0 [48,7; 92,1]*	66,8 [39,2; 88,8]*	71,0 [37,7; 85,7]*	1/2=0,6115 1/3=0,0853 2/3=0,2062
6	HLA-RD ⁺ моноциты, %	83,5 [79,4; 93,9]	72,0 [43,5; 87,1]*	73,1 [54,1; 89,4]	82,0 [57,7; 90,0]	1/2=0,3595 1/3=0,4977 2/3=0,8736

7	Лимфоциты, %	32,4 [27,6; 34,6]	10,5 [8,8; 16,5]*	13,0 [9,7; 16,3]*	17,0 [10,5; 27,0]*	1/2=0,2365 1/3<0,0001 2/3=0,0007
8	HLA-RD ⁺ лимфоциты, %	10,9 [9,4; 15,6]	19,5 [13,1; 26,7]*	12,9 [10,1; 16,7]	10,5 [7,5; 14,5]	1/2=0,0008 1/3=0,0002 2/3=0,3605
9	CD25 ⁺ лимфоциты, %	6,0 [4,1; 9,3]	16,4 [11,7; 19,3]*	16,0 [11,9; 19,7]*	13,7 [10,0; 17,8]*	1/2=0,6900 1/3=0,0080 2/3=0,0360
10	ИРИ CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , у.е.	1,40 [1,24; 1,62]	2,09 [1,4; 3,05]*	2,02 [1,37; 2,48]*	1,56 [1,00; 2,29]	1/2=0,3671 1/3=0,0209 2/3=0,2069
11	CD16 ⁺ естественные киллеры-1, %	10,0 [7,2; 12,3]	6,2 [3,5; 10,8]*	6,0 [4,7; 9,71]*	7,0 [3,9; 10,8]*	1/2=0,8076 1/3=0,6227 2/3=0,7920
12	CD56 ⁺ естественные киллеры-2, %	9,7 [7,2; 10,5]	5,0 [2,3; 8,7]*	5,5 [3,9; 8,9]	6,3 [3,5; 9,6]	1/2=0,6104 1/3=0,6545 2/3=0,9029
13	CD21 ⁺ В-лимфоциты, %	8,7 [7,9; 10,4]	14,5 [9,4; 21,9]*	9,8 [6,1; 15,9]*	7,6 [5,0; 12,0]	1/2=0,0093 1/3=0,0018 2/3=0,4020
14	IgG, г\л	9,7 [9,0; 11,0]	6,3 [5,4; 7,6]*	7,8 [6,9; 10,5]*	7,9 [7,1; 9,9]*	1/2<0,0001 1/3<0,0001 2/3=0,8028
15	IgM, г\л	1,34 [1,01; 1,60]	0,70 [0,52; 1,10]*	0,80 [0,61; 1,09]*	0,78 [0,65; 1,00]*	1/2=0,1824 1/3=0,1557 2/3=0,7418

Примечание:

значения Р – при сравнении показателей основной группы на разных сроках лечения (1/2; 1/3; 2/3)

* - Р <0,05 достоверные различия при сравнении показателей основной группы с показателями контрольной группы

В сравнении с группой контроля из 45 исследуемых показателей иммунного статуса достоверно значимые изменения у обожженных выявлены только по 15 ключевым иммунным маркерам, относительно которых в дальнейшем проведен сравнительный анализ в динамике. Существенно повышенными ($p < 0,0001$) оказались следующие показатели: среднее содержание лейкоцитов, палочкоядерные нейтрофилы, индекс сдвига лейкоцитов крови, лейкоцитарный индекс интоксикации, В-лимфоциты,

ИРИ, гранулоциты с экспрессией CD64⁺, лимфоциты с экспрессией HLA-DR⁺ и CD25⁺. При этом выявлено достоверное снижение относительных показателей общих лимфоцитов ($p < 0,0001$), естественных киллерных лимфоцитов CD16⁺ ($p < 0,0074$) и CD56⁺ ($p < 0,0496$), моноцитов с экспрессией HLA-DR⁺ ($p < 0,0058$). Также отмечался выраженный дефицит ($p < 0,0001$) сывороточного содержания иммуноглобулинов IgG = 6,3 [5,4; 7,6] г/л и IgM=0,70 [0,52; 1,10] г/л против их концентрации у здоровых доноров IgG=9,7 [9,0; 11,0] г/л и IgM=1,34 [1,01; 1,60] г/л. Необходимо отметить, что у 22 (40%) больных отмечался очень низкий уровень IgG < 6,0 г/л.

Выраженный дисбаланс иммунного статуса, свидетельствует о развитии альтернативных иммунных процессов в организме на фоне обширной ожоговой травмы и наличии инвазивной раневой инфекции. С одной стороны происходит гиперактивация иммунной системы с преобладанием маркеров системной воспалительной реакции и эндогенной интоксикации, с другой стороны развивается иммунодефицит клеточного и гуморального иммунных звеньев преимущественно на уровне киллерных клеток и ключевых иммуноглобулинов IgG и IgM.

На $23,6 \pm 2,5$ сутки после травмы (10 сутки специализированного лечения) у пациентов основной группы отклонения от нормальных показателей по сравнению с контрольной группой были отмечены по 12 иммунным маркерам из 15 (таблица 5.1.). В сравнении с предыдущим сроком наблюдения нормализовался уровень естественных киллеров-2 (CD56⁺), моноцитов и лимфоцитов с экспрессией важного активационного антигена гистосовместимости II класса HLA-DR⁺, участвующего в антигенпрезентации и кооперации иммунных клеток для осуществления полноценного иммунного ответа.

Выявлены положительные изменения гуморального иммунного звена с достоверными различиями, относительно показателей при поступлении в стационар, по содержанию В-лимфоцитов ($p_{1/2} = 0,0093$) и IgG ($p_{1/2} < 0,0001$). Кроме того, возросло число больных в 1,9 раза с нормализованным уровнем

иммуноглобулина IgG при снижении в 2,4 раза количества больных, имеющих ранее выраженный дефицит иммуноглобулина IgG $<6,0$ г\л. Напротив, увеличение лейкоцитоза ($p1/2=0,0116$) при положительной динамике уровня палочкоядерных нейтрофилов ($p1/2=0,0227$) и без отрицательной динамики высоких индексов эндогенной интоксикации ИСЛК, ЛИИ и «септического» маркера CD64⁺ гранулоцитов свидетельствовало о сохранении инфекционно-воспалительного процесса и эндогенной интоксикации, наличии инвазивной раневой инфекции и риске её генерализации.

Всем больным проводилось поликомпонентное интенсивное общее лечение ожоговой болезни и профилактика ее осложнений. На фоне продолжения лечения ожоговой болезни, направленного на протекцию органных дисфункций и элиминацию микробных антигенов и токсинов, на этапе подготовки глубоких ожогов к операции применялись методы местного хирургического лечения - этапные хирургические некрэктомии и местного консервативного лечения с использованием ксенотрансплантов и повязок с растворами антисептиков. В дальнейшем хирургическое лечение заключалось в выполнении хирургической обработки (иссечения грануляций) (рис. 5.5) и аутодермопластики гранулирующих ран (рис. 5.6).



Рис. 5.5. Хирургическая обработка (иссечение грануляций) гранулирующих ран циркулярным электродерматомом



Рис. 5.6. Свободная аутодермопластика гранулирующих ран расщепленным перфорированным 1:6 аутодермотрансплантатом

В результате к $40,8 \pm 2,9$ суткам после ожоговой травмы в исследуемой группе пациентов удалось выполнить от одной до трех операций по

аутодермопластике и восстановить кожные покровы на площади $10,6 \pm 1,1$ % поверхности тела. В большинстве случаев достигнуто полное приживление пересаженных аутодермотрансплантатов с эпителизацией в ячейках.

По мере закрытия ожоговых ран также отмечено последовательное восстановление ключевых маркеров иммунной системы. Произошло достоверное снижение ($p < 0,05$) показателей воспалительной реакции и эндогенной интоксикации: лейкоцитоза, п/я нейтрофилов, индексов ИСЛК и ЛИИ. Нормализовался индекс иммунорегуляции Т-клеточного иммунного звена $CD4^+/CD8^+$ с купированием ранее глубокой лимфопении ($p_{1/3} < 0,0001$) и восстановлением уровня лимфоидных клеток с экспрессией функциональных маркеров ($CD25^+$, $HLA-DR^+$), что во многом предотвратило возможность развития дефицита субпопуляций Т-клеточного иммунного звена.

За время наблюдения уровень иммуноглобулина IgM в исследуемой группе пациентов достоверно не изменился. Тогда как средний уровень иммуноглобулина IgG имел тенденцию к нормализации на 10-е сутки от начала комплексного лечения ($p_{1/2} < 0,0001$) без отрицательной динамики к окончанию срока наблюдения ($p_{2/3} = 0,8028$). При этом полностью нормализовался маркер клеточного компонента гуморального иммунного звена $CD21^+$ (В-лимфоциты) (таблица 5.1). Позитивные изменения иммунного статуса с купированием эндогенной интоксикации и нормализацией антимикробного потенциала в целом позволили эффективно продолжить хирургическое лечение по восстановлению кожного покрова на фоне комплексной терапии тяжелообожженных.

Необходимо отметить, что нормализация иммунного статуса, отмеченная у больных, которым удалось своевременно удалить нежизнеспособные ткани на большей площади поражения и начать восстановление кожного покрова с пластическим закрытием ожоговых ран в более ранние сроки, позволила предотвратить развитие септических осложнений у 43 (78,2%) пациентов.

В то же время у 12 (21,8%) пациентов с обширной ожоговой травмой и выявленным при первичном иммунологическом обследовании глубоким дефицитом факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа течение ожоговой болезни осложнилось развитием сепсиса в среднем на $9,7 \pm 3,1$ сутки после травмы. Лечение данной категории больных потребовало дополнительных лечебных мероприятий по купированию системного инфекционно-воспалительного процесса, в том числе с использованием технологий экстракорпоральной и интенсивной терапии, направленных на стабилизацию органных нарушений и общего гомеостаза в целом для осуществления дальнейшего этапного хирургического лечения и пластического закрытия ожоговых ран. Клинико-иммунологическая эффективность с регрессией явлений сепсиса отмечена у 9 пациентов. У 3 (5,5%) больных с сепсисом, у которых не удалось интенсифицировать местное лечение, наступил летальный исход. Из особенностей иммунного статуса этих больных отмечен глубокий дефицит содержания иммуноглобулина IgG 2,79-5,8 г/л, причем у 2-х пациентов он сохранялся на всем протяжении исследования.

Таким образом, показана целесообразность мониторинга иммунного статуса на разных этапах комплексного лечения тяжелообожженных пациентов для своевременного выявления иммунных нарушений и диагностики гнойно-септических осложнений, а также для оценки эффективности хирургического лечения и необходимости использования иммунозаместительной терапии. Особо следует подчеркнуть значение активной хирургической тактики, направленной на своевременное удаление нежизнеспособных тканей и восстановление целостности кожного покрова [26].

5.2 Анализ регенераторного потенциала на клеточном и субклеточном уровне у больных с обширными ожогами

Одним из новых направлений в комплексном лечении больных с обширными ожогами является оценка тканевой регенерации, в том числе на клеточном и субклеточном уровне.

Впервые нами применен многопараметрический фенотипический анализ гемопоэтических стволовых клеток и их субпопуляций для иммунодиагностики регенераторного потенциала на этапах хирургического лечения по восстановлению целостности кожного покрова у больных с ожогами.

Для оптимизации технологии выделения из периферической крови различных фенотипов гемопоэтических стволовых клеток методом проточной цитометрии нами был модифицирован протокол поэтапного выделения ГСК на основе Dot Plot анализа образцов с автоматическим расчетом относительного и абсолютного уровня ГСК разных фенотипов, а также расчетом соотношения зрелых и незрелых субпопуляций ГСК, в том числе жизнеспособных субпопуляций ГСК.

На рисунке 5.7. представлен указанный протокол технологии поэтапного выделения ГСК методом проточной цитометрии.

Производят сбор не менее 5×10^5 абсолютного количества клеток (событий) в пробе. Среди клеток по боковому светорассеянию, соответствующему лимфоцитам (R1), выделяют популяцию стволовых клеток позитивную по маркеру CD34⁺. Далее для более точного выделения отбирают клетки одновременно несущие маркер CD45 с низким уровнем интенсивности (dim) и CD34 выделяют клетки, с определением относительного количества (%) общей популяции ГСК, в том числе жизнеспособных с коэкспрессией маркеров CD45^{dim}CD34⁺, соответствует R2. Далее производят отсечку детрита и мертвых клеток (R3) и с помощью дополнительных стадий гейтирования среди всех жизнеспособных клеток CD45^{dim}CD34⁺ определяют распределение позитивных и негативных клеток

по маркерам CD38 или CD133. Таким образом, получают распределение популяции $CD45^{\text{dim}}CD34^+$ на $CD38^-$ и $CD38^+$ или на $CD133^-$ и $CD133^+$. Таким образом, визуализируют субпопуляции ГСК с различными свойствами: $CD45^{\text{dim}}CD34^+CD133^-$ (LL), $CD45^{\text{dim}}CD34^+CD133^+$ (LR), $CD45^{\text{dim}}CD34^+CD38^-$ (LL), $CD45^{\text{dim}}CD34^+CD38^+$ (LR).

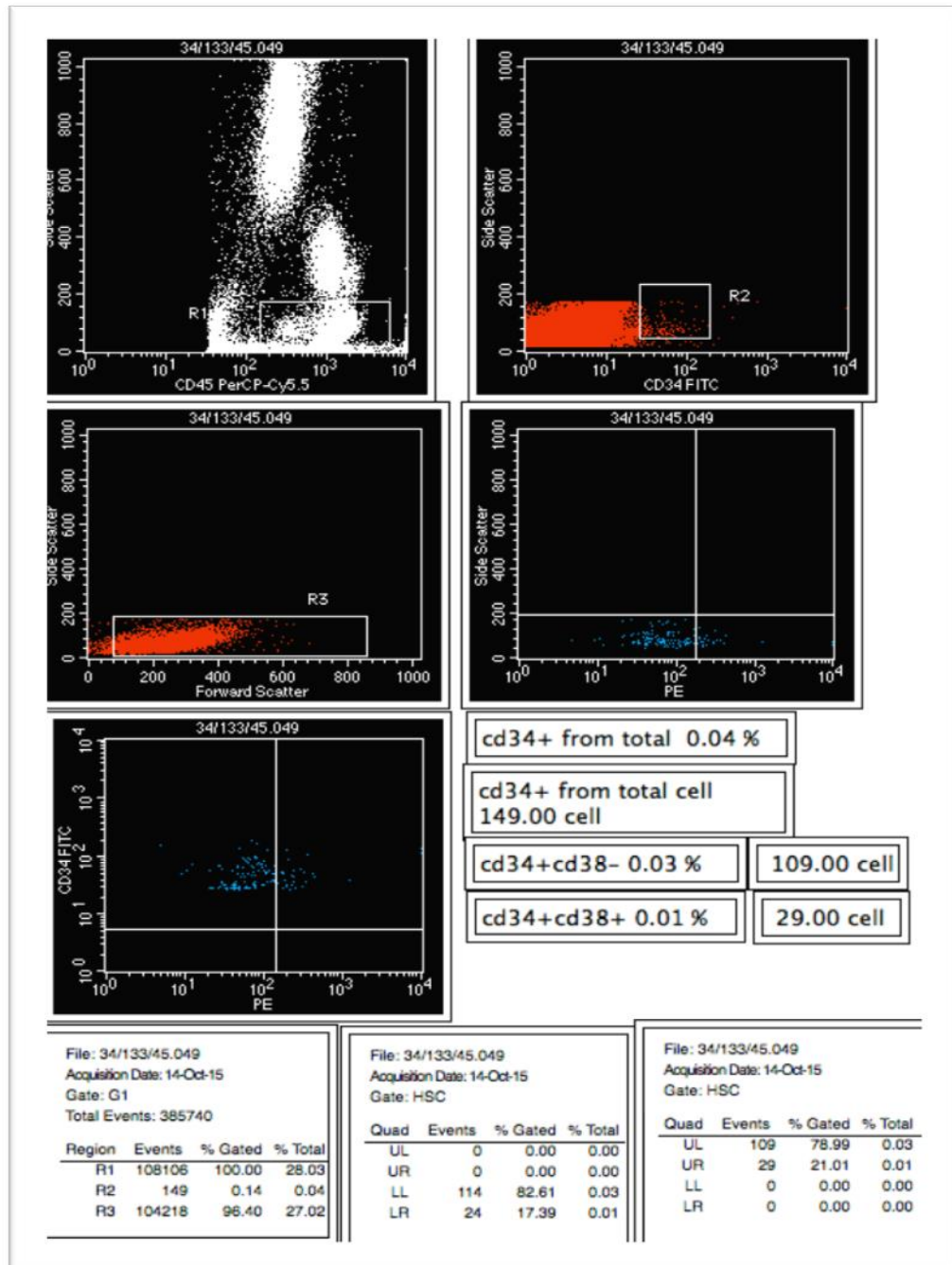


Рис. 5.7. Протокол выделения циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови (проточная цитофлуориметрия)

Относительное количество популяций ГСК (C) рассчитывают в % от числа собранных клеток лимфоцитарного полигона по формуле:

$$C=A/B \times 100$$

A - количество клеток лимфоцитарного полигона с экспрессией маркеров соответствующих фенотипам ГСК, **B** - общее количество всех собранных клеток (событий) на проточном цитометре.

Абсолютное количество популяций ГСК (D) рассчитывают в $10^9/\text{л}$ относительно уровня общих лейкоцитов (**L**) в пробе крови пациента по формуле:

$$D=L \times C/100$$

L – уровень лейкоцитов в крови $\times 10^9/\text{л}$, **C** - количество ГСК в %, **D** - количество ГСК $\times 10^9/\text{л}$.

Используя данный способ изучения гемопоэтических стволовых клеток методом проточной цитометрии определены средние показатели в % различных популяций ГСК крови у 15 здоровых лиц в возрасте $33,9 \pm 4,7$ лет для последующего сравнительного анализа содержания ГСК с показателями пациентов [28]. Результаты представлены в таблице 5.2.

Клетки, экспрессирующие маркеры $CD45^+CD34^+$ соответствовали общей популяции ГСК. Причем количество их в образцах периферической крови у конкретного донора достоверно не изменялось независимо от использованного дополнительного маркера CD38 или CD133, что служило контролем качества пробоподготовки и выполнения проточной цитометрии по выделению ГСК в соответствии с протоколом.

Таблица 5.2. Содержание популяций ГСК у здоровых доноров [28]

Популяции ГСК	Здоровые добровольцы (n=15), %
CD45⁺34⁺	0,048±0,005
CD45^{dim}34⁺38⁻	0,031± 0,003
CD45^{dim}34⁺38⁺	0,017±0,003
CD45^{dim}34⁺133⁻	0,017±0,003
CD45^{dim}34⁺133⁺	0,032±0,004

Из общих ГСК доля специфических клеток относящихся преимущественно к ранним предшественникам гемопоэза: негативных по CD38 и позитивных по CD133, составила в среднем одинаковый процент. Относительный средний уровень зрелых ГСК: позитивных по CD38 и негативных по CD133, также статистически не отличался.

Впервые проведены исследования по изучению динамики уровня циркулирующих ГСК в периферической крови у 15 пациентов с ожогами (7 мужчин и 8 женщин) медиана (Me) общей площади термического поражения составила 45,0 % поверхности тела, медиана возраста - Me = 46,0 год.

При анализе сводных результатов исследования циркулирующих ГСК у ожоговых пациентов, представленных в таблице 5.3, содержание популяций стволовых клеток при ожоговой болезни сильно различалось и могло колебаться от полного отсутствия до высокого и очень высокого уровня. По этой причине определить среднее содержание клеток по группам не представлялось возможным из-за очень большого разброса данных у пациентов, нередко составляя порядковые различия (десятикратные), не позволяя обнаружить истинные различия между группами больных.

**Таблица 5.3. Сводная таблица результатов исследования
циркулирующих ГСК у ожоговых пациентов**

№ ПАЦИЕНТ	ВОЗРАСТ, лет	ПЛОЩАДЬ ожога, % п.т.	СУТКИ после травмы	ГСК 45/34/38, %	CD45 ^{dim} 34 ⁺ 38 ⁻ , %	CD45 ^{dim} 34 ⁺ 38 ⁺ , %	ГСК 45/34/133 %	CD45 ^{dim} 34 ⁺ 133 ⁻ , %	CD45 ^{dim} 34 ⁺ 133 ⁺ , %
1	66	45	18	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03	0,01
2	35	80	7	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02
3	53	45	4	0,02	0,02	0	0,03	0,01	0,02
			16	0,02	0,01	0,01	0,04	0,02	0,02
			28	0,06	0,03	0,03	0,06	0,02	0,04
4	27	50	4	0,31	0,26	0,05	0,32	0,26	0,06
			15	0,11	0,07	0,04	0,13	0,09	0,04
			23	0,23	0,08	0,15	0,22	0,06	0,16
5	30	60	8	0,1	0,05	0,05	0,12	0,07	0,04
			15	0,08	0,03	0,05	0,1	0,08	0,02
			22	0,04	0,03	0,01	0,06	0,02	0,04
6	20	40	8	0,08	0,06	0,02	0,08	0,02	0,06
			15	0,06	0,03	0,03	0,06	0,04	0,02
7	56	45	12	0,1	0,05	0,05	0,1	0,07	0,03
			24	0,08	0,07	0,01	0,08	0,04	0,04
			32	0,03	0,03	0	0,03	0	0,03
8	83	25	12	0,04	0,03	0,01	0,04	0,02	0,02
			24	0,13	0,1	0,03	0,13	0,07	0,06
9	56	60	10	0,05	0,04	0,01	0,05	0,02	0,03
			17	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02
10	45	30	3	0,02	0,02	0	0,02	0	0,02
			9	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02
			18	0,02	0,02	0	0,02	0,01	0,01
11	37	35	11	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02
			20	0,11	0,1	0,01	0,11	0,07	0,04
12	39	80	7	0,04	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02
			9	0,04	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02
			13	0,04	0,03	0,01	0,04	0,01	0,03
			26	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02
13	27	42	6	0,25	0,23	0,02	0,25	0,1	0,15
			12	0,36	0,18	0,17	0,28	0,21	0,07
14	47	55	34	0,06	0,04	0,02	0,06	0,01	0,05
			39	0,12	0,09	0,03	0,12	0,03	0,09
			44	0,06	0,05	0,01	0,06	0,01	0,05
15	56	35	56	0,09	0,05	0,04	0,09	0,01	0,08

В связи с чем, пациенты были разделены на три кластера - пациенты с высоким, очень высоким содержанием ГСК или с их полным отсутствием. При таком подходе были обнаружены достоверные различия по уровню ГСК и их субпопуляциям у обожженных больных.

Однако, как и у здоровых доноров, у ожоговых пациентов суммарно по группам различия в среднем содержании двух типов общих ГСК $CD45^{+}34^{+}$ ($CD45/34/38^{-} = 0,0725 \pm 0,010\%$ и $CD45/34/133^{-} = 0,0727 \pm 0,0098\%$, $p > 0,05$) их ранних субпопуляций ГСК ($CD45^{dim}34^{+}38^{-} = 0,048 \pm 0,008\%$ и $CD45^{dim}34^{+}133^{+} = 0,04 \pm 0,006\%$, $p > 0,05$) и зрелых ГСК ($CD45^{dim}34^{+}38^{+} = 0,024 \pm 0,004\%$ и $CD45^{dim}34^{+}133^{+} = 0,035 \pm 0,006\%$, $p > 0,05$), также между собой статистически не различались. Т. е. различия между соответствующими фенотипическими группами одного типа клеток достоверно не изменялось независимо от использованного дополнительного маркера CD38 или CD133.

При сравнении результатов с кластерами ожоговых пациентов и доноров в общей группе обожженных пациентов было 50% больных с высоким ($0,134 \pm 0,019\%$, $p < 0,012$) и 30% с очень высоким содержанием общих ГСК $CD45^{+}34^{+}$ ($0,184 \pm 0,029\%$, $p = 0,0015$), которые намного превышали их количество у доноров $CD45^{+}34^{+} = 0,048 \pm 0,005\%$.

Не менее выраженное повышение относительного количества ранних субпопуляций ГСК ($CD45^{+}34^{+}38^{-}$) в сравнении с группой доноров отмечено у 43,3 % пациентов с высоким ($0,096 \pm 0,018\%$ и $0,031 \pm 0,003\%$, $p = 0,028$) и у 16,7% с очень высоким возрастанием ($0,21 \pm 0,045\%$ и $0,031 \pm 0,003\%$, $p = 0,0001$) стволовых клеток. Соответственно у 46,7% пациентов равнозначных групп содержание субпопуляций ранних ГСК с фенотипом $CD45^{+}34^{+}133^{+}$ также резко возрастало в сравнении с донорами.

Изменения содержания у ожоговых больных отмечены и в отношении двух зрелых субпопуляций ГСК ($CD45^{+}34^{+}38^{+}$ и $CD45^{+}34^{+}133^{+}$) как и ранее разделенных на кластеры. По субпопуляции $CD45^{+}34^{+}38^{+}$ у 53,3% произошло достоверное возрастание уровня клеток $0,057 \pm 0,009\%$, в сравнении с

донорами $0,017 \pm 0,003\%$, ($p=0,006$). Аналогичные результаты получены у пациентов при анализе другой субпопуляции зрелых ГСК ($CD45^{+}34^{+}133^{-}$).

Таким образом, у определенного количества обожженных пациентов отмечалось резкое повышение содержания общих ГСК, как и субпопуляций ранних и зрелых ГСК, причем различия были высоко достоверны. Выраженная количественная модуляция содержания ГСК может отражать активацию костного мозга для восстановления нарушенного гомеостаза с адаптацией регенераторных возможностей организма. Наиболее вероятно, данный процесс можно рассматривать как естественную защитную реакцию при воздействии различных, в т.ч. ожоговых травматических факторов. Определенная роль в этом случае может принадлежать обширной и тяжелой термической травме с термоингаляционным повреждением, кровопотерей, сочетанной комбинированной травмой с переломами костей, когда нельзя исключить дополнительного выхода в циркулирующее русло ГСК из их депо.

Подтверждением этой возможности является клинический случай пациента Я, 27 лет, с сочетанной ожоговой травмой площадью 50% поверхности тела и множественными переломами трубчатых костей, у которого относительный уровень общих ГСК $CD45^{+}CD34^{+}$ в несколько раз превышал нормальные показатели и сохранялся продолжительное время в динамике (рис. 5.8).

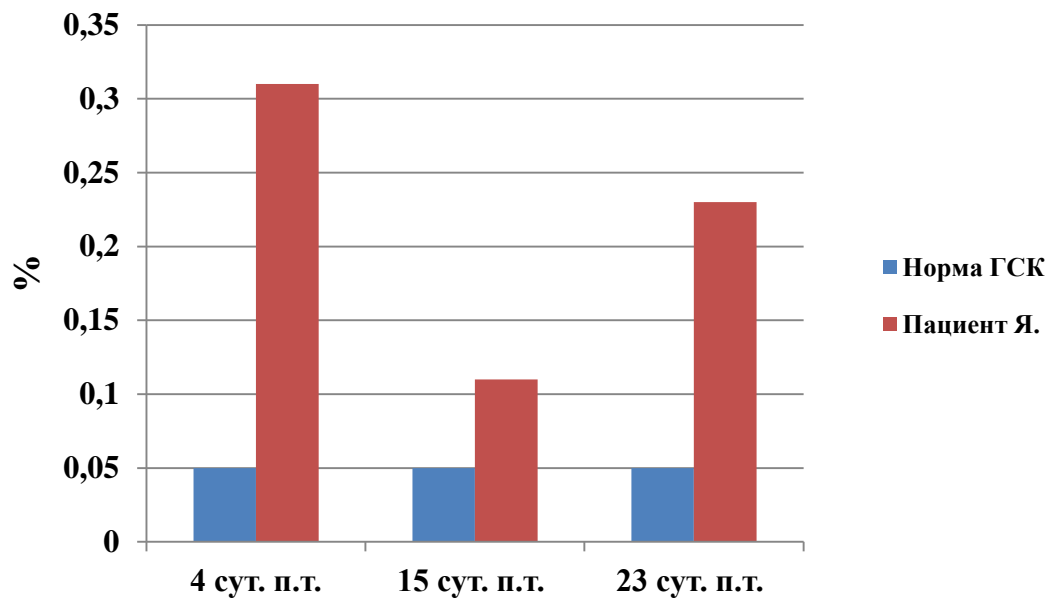


Рис. 5.8. Содержание ГСК CD45⁺CD34⁺ (%) у пациента Я. в различные сроки комбинированной ожоговой травмы с множественными переломами трубчатых костей

Особое значение имеет исчезновение из циркуляции у части больных некоторых субпопуляций ГСК, что может обуславливаться истощением пула этих клеток или их токсическим повреждением. Причем исходный дефицит общих ГСК, как правило, у данной категории больных сопровождался низкими значениями относительного (%) уровня зрелых субпопуляций CD45^{dim}34⁺38⁺ и CD45^{dim}34⁺133⁻, который плохо восстанавливался в динамике.

По-видимому, возрастание циркулирующих ГСК может служить благоприятным фактором, способствующим тканевой регенерации и эффективному заживлению ожоговых ран после проведенных аутодермопластик. В то же время, у пациентов с вялыми грануляциями и медленным заживлением ран, лизисом аутодермотрансплантатов мы наблюдали глубокий дефицит популяций ГСК, что может подтверждать прогностическое использование данных маркеров для оценки

регенераторного потенциала организма и прогноза развития осложнений ожоговой болезни.

Однако, из-за малого количества исследований, особенно в исходном периоде ожоговой травмы, а также отсутствия более глубокого анализа клинико-лабораторных данных, сопоставления их с клиническим течением ожоговой болезни на фоне проводимого комплексного лечения – требовалось дальнейшее изучение кинетики ГСК в дополнение к текущему протоколу.

5.3. Оценка эффективности этапного хирургического лечения у пациентов с обширными ожогами на основе анализа фенотипических маркеров гемопоэтических стволовых клеток

Дальнейшей задачей исследования стало изучение в динамике содержания маркеров гемопоэтических стволовых клеток разных фенотипов и их диагностической значимости при заживлении ожоговых ран на этапах хирургического лечения пациентов с обширными ожогами.

Исследование гемопоэтических стволовых клеток разных фенотипов выполнено у 25 пациентов с обширными ожогами двукратно: при поступлении в Ожоговый центр НМИЦ хирургии им А.В. Вишневского (на 1-15 сутки после травмы) и через 20 дней комплексного лечения, включающего местное медикаментозное лечение ожоговых ран с использованием современных раневых покрытий, хирургическую некрэктомию и кожную пластику для закрытия ран.

Возраст больных в среднем был $42,4 \pm 4,7$ года. Площадь ожогового поражения при поступлении составила у пациентов в среднем $44,0 \pm 4,7$ % поверхности тела. В качестве референсных значений были приняты показатели ГСК ранее обследованных 15 здоровых доноров в возрасте $33,9 \pm 4,7$ лет. По гендерным показателям и возрасту доноры и пациенты достоверно не различались ($p = 0,22$).

В исследуемой группе тяжелообожженных пациентов, в сравнении с группой здоровых добровольцев, при поступлении в Ожоговый центр

выявлен достоверный глубокий дефицит в периферической крови общих гемопоэтических клеток $CD45^{+}34^{+}$ ($0,022 \pm 0,003$ %, $p=0,0002$), который восстановился в процессе лечения ($0,05 \pm 0,012$ %, $p=0,0307$) (рис. 5.9).

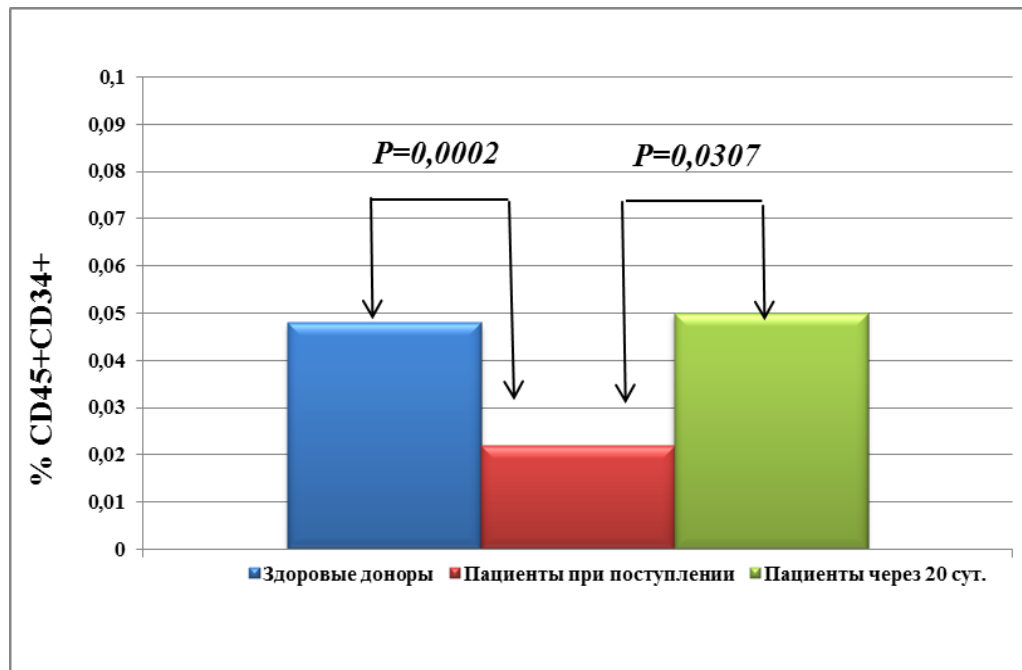


Рис. 5.9. Динамика относительного (%) количества общих ГСК $CD45^{+}34^{+}$ в крови пациентов с ожогами в процессе комплексного лечения

Надо отметить, что восстановление уровня общих ГСК происходило быстрее у пациентов, которым удалось провести этапное хирургическое лечение ожоговых ран в более ранние сроки ожоговой болезни при отсутствии гнойно-септических осложнений.

На рисунках 5.10 и 5.11 приведены примеры визуальной оценки содержания ГСК у пациентов с нормальным уровнем ГСК и при их фактически полном отсутствии.

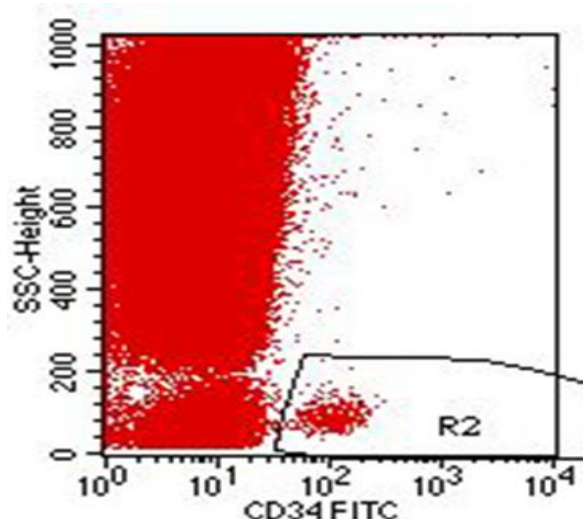


Рис. 5.10. Dot Plot с нормальным содержанием общих ГСК CD45⁺34⁺ (R2) (проточная цитометрия)

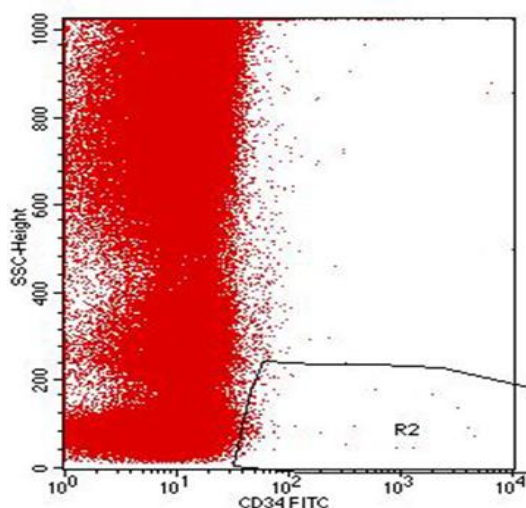


Рис. 5.11. Dot Plot с дефицитом содержания общих ГСК CD45⁺34⁺ (R2) (проточная цитометрия)

При изучении содержания у тяжелообожженных пациентов различных субпопуляций ГСК, отражающих в том числе репаративные процессы в очагах ожогового поражения, при поступлении также выявлен дефицит CD45^{dim}34⁺38⁺ клеток ($p=0,0188$), причем преимущественно «не зрелых» ГСК CD45^{dim}34⁺38⁻ ($p=0,0001$) и ранних предшественников гемопоэза CD45^{dim}34⁺133⁺ ($p=0,0002$) (табл. 5.4), что может свидетельствовать о подавлении компенсаторно-приспособительных реакций гемопоэза на этапах поступления больных в тяжелом клиническом состоянии, когда еще не

применен весь необходимый комплекс лечебных мероприятий, направленных в первую очередь на компенсацию и протекцию жизненно-важных функций и внутренних констант организма, коррекцию интоксикационного синдрома, профилактику инвазивной раневой инфекции, в т.ч. методы хирургического воздействия на первичные очаги ожогового поражения.

В процессе комплексного лечения на 20-е сутки у больных с тяжелыми ожогами отмечается достоверное повышение (до уровня здоровых лиц) основной субпопуляции ГСК $CD45^{dim}34^{+}38^{-}$ ($0,039 \pm 0,009\%$, $p=0,0155$). При этом дефицит популяций $CD45^{dim}34^{+}38^{+}$ и $CD45^{dim}34^{+}133^{+}$ восстановился не полностью. В популяции $CD45^{dim}34^{+}133^{-}$ отмечено достоверное возрастание в процессе лечения этих клеток в сравнении с исходным периодом, когда их уровень не отличался от группы здоровых лиц (см. табл. 5.4).

Таблица 5.4. Содержание субпопуляций ГСК у здоровых лиц и пациентов с ожогами в динамике

Популяции ГСК	Здоровые добровольцы (n=15)	Пациенты с ожогами (n=25)			
		при поступлении Mean±SEM	P	на 20 сутки лечения Mean±SEM	P
$CD45^{dim}34^{+}38^{-} \%$	$0,031 \pm 0,003$	$0,013 \pm 0,002$	0,0001#	$0,039 \pm 0,009$	0,0155*
$CD45^{dim}34^{+}38^{+} \%$	$0,017 \pm 0,003$	$0,007 \pm 0,002$	0,0188#	$0,012 \pm 0,004$	0,2721
$CD45^{dim}34^{+}133^{-} \%$	$0,017 \pm 0,003$	$0,010 \pm 0,003$	0,0785	$0,028 \pm 0,008$	0,0380*
$CD45^{dim}34^{+}133^{+} \%$	$0,032 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,003$	0,0002#	$0,020 \pm 0,006$	0,1879

Обозначения: # - достоверные различия между группой здоровых добровольцев и ожоговыми пациентами при поступлении; * достоверные различия между группами пациентов при поступлении и на фоне лечения

Эти данные напрямую коррелировали с улучшением общего состояния пациента, эпителизацией поверхностных и пограничных ожогов и очищения глубоких ожоговых ран от некротических тканей. Раны были подготовлены к операции по пересадке кожи. Всем этим пациентам проведены этапные

аутодермопластики с хорошим результатом приживления пересаженных аутодермотрансплантатов.

Выраженный дефицит содержания общих ГСК и их ранних и зрелых субпопуляций, по нашему мнению, может быть обусловлен обширной и тяжелой термической травмой с подавлением регенераторного потенциала этих клеток и возможной усиленной миграцией из периферической крови в область ожоговых ран при поступлении в ожоговый центр, когда еще не начат весь комплекс специализированной хирургической и высокотехнологичной медицинской помощи пострадавшим от ожогов, в целом направленной на восстановление общего гомеостаза и органной дисфункции, снижение эндогенной интоксикации организма и предупреждение инвазивной раневой инфекции, в том числе за счет своевременного этапного хирургического удаления некротизированных тканей и ожогового струпа, для подготовки к аутодермопластике по закрытию ожоговых ран.

Выявленные впервые модуляции содержания ГСК при ожогах имеют большое фундаментально прикладное значение. В результате активного хирургического лечения с использованием в ранние сроки некрэктомии, направленной на удаление нежизнеспособных тканей у пациентов с обширными глубокими ожогами наблюдается благоприятное течение ожоговой болезни и раневого процесса с развитием грануляционной ткани, нивелируется глубокий дефицит ГСК в процессе адекватного комплексного лечения и активируются тканевые регенераторные процессы. В то же время, у части пациентов с вялыми грануляциями и медленным заживлением ран, лизисом аутодермотрансплантатов мы наблюдали стойкое исчезновение некоторых субпопуляций ГСК, что может быть связано с истощением пула этих клеток или их токсическим повреждением [28].

Полученные результаты сравнительного анализа в периферической крови различных субпопуляций ГСК, отражающих, в том числе репаративные процессы у больных с ожогами, подтверждают

целесообразность использования данных маркеров для диагностики регенераторного потенциала при заживлении ожоговых ран, в том числе в процессе этапного хирургического лечения и аутодермопластики.

5.4. Способ оценки системного регенераторного потенциала у ожоговых больных для определения готовности ожоговых ран к аутодермопластике

На основании проведенных исследований сделан вывод о возможности использования отдельных маркеров гемопоэтических стволовых клеток для предиктивной оценки регенераторного потенциала при заживлении ожоговых ран, в том числе в процессе этапного хирургического лечения и аутодермопластики, прогноза развития местных и общих осложнений ожоговой болезни.

Однако, для объективной оценки системного регенераторного потенциала определение монопоказателей общих субпопуляций ГСК оказывается недостаточным, поскольку они не учитывают содержание жизнеспособных ГСК в общем пуле белых клеток крови в пробе и лейкоцитов в периферической крови пациента, что может существенно влиять на полученные результаты.

Предлагаемый нами способ объективной оценки системного регенераторного потенциала у больных с ожогами основан на определении методом проточной цитометрии совокупности ключевых маркеров - *жизнеспособных субпопуляций ГСК* с коэкспрессией $CD45^{dim}CD34^{+}$, $CD45^{dim}CD34^{+}CD38^{+}$, $CD45^{dim}CD34^{+}CD38^{-}$, обладающих разной степенью зрелости и регенеративной активностью, а также расчетом конкретных числовых/пороговых показателей (относительных и абсолютных) и их соотношений в зависимости от содержания общих белых клеток крови в пробе, общей популяции жизнеспособных ГСК и уровня лейкоцитов в периферической крови пациента.

Способ реализуют следующим образом.

Для анализа содержания субпопуляций гемопоэтических стволовых клеток у пациента производят забор периферической венозной крови утром, натощак в стандартные стерильные пробирки с антикоагулянтом К₃ЭДТА в объеме 2,7 мл. Для фенотипирования субпопуляционного состава ГСК проводят трехцветное окрашивание клеток с использованием панели моноклональных антител к маркерам: CD45 PerCPCy5.5, CD34 FITC, CD38 PE. Подготовку проб для анализа проводят в полистероловых пробирках объемом 5 мл, совместимых с проточным цитометром, для чего смешивают по 5 мкл соответствующих моноклональных антител и 100 мкл цельной крови с экспозицией 20 минут, далее добавляют 1000 мкл лизирующего раствора BD FACS Lysing solution (BD Biosciences, США), через 20-30 минут после лизиса эритроцитов выполняют фенотипирование в подготовленных пробах методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре аналитического типа, например FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Производят сбор не менее 5×10^5 абсолютного количества клеток (событий) в пробе. Среди клеток по боковому светорассеянию, соответствующему лимфоцитам, выделяют популяцию стволовых клеток позитивную по маркеру CD34⁺. Далее выделяют клетки, одновременно несущие маркер CD45 с низким уровнем интенсивности (dim) и CD34 с определением количества общей популяции жизнеспособных ГСК с коэкспрессией маркеров CD45^{dim}CD34⁺.

Далее с помощью дополнительных стадий гейтирования среди всех жизнеспособных клеток CD45^{dim}CD34⁺ определяют распределение позитивных и негативных клеток по маркеру CD38. Таким образом, получают абсолютное количество жизнеспособных общих ГСК с коэкспрессией маркеров CD45^{dim}CD34⁺ - параметр **A1**, и их субпопуляций: CD45^{dim}CD34⁺CD38⁺ («зрелые» ГСК) - параметр **A2**, CD45^{dim}CD34⁺CD38⁻ («не зрелые» ГСК) – параметр **A3**.

Затем определяют:

- процентное содержание общей популяции жизнеспособных ГСК – параметр **C1**, зрелых клеток - параметр **C2**, и/или незрелых клеток – параметр **C3**, в общем количестве всех белых клеток крови в пробе (**B**), по формулам: $C1=(A1/B) \times 100$, $C2=(A2/B) \times 100$, $C3=(A3/B) \times 100$;

- процентное содержание субпопуляций зрелых клеток – параметр **C4**, и/или незрелых клеток – параметр **C5**, в популяции жизнеспособных общих ГСК с коэкспрессией маркеров $CD45^{dim}CD34^{+}$ (**A1**), по формулам: $C4=(A2/A1) \times 100$, $C5=(A3/A1) \times 100$;

- количественное содержание, в $10^9/л$, общей популяции жизнеспособных ГСК - параметр **D1**, субпопуляций зрелых клеток - параметр **D2**, и/или незрелых клеток – параметр **D3**, в общем количестве всех белых клеток крови и относительно уровня общих лейкоцитов в периферической крови пациента (**L**), по формулам: $D1=(L \times C1)/100$, $D2=(L \times C2)/100$, $D3=(L \times C3)/100$;

- количественное содержание, в $10^9/л$, зрелых клеток - параметр **D4**, и/или незрелых клеток – параметр **D5**, в популяции жизнеспособных ГСК с коэкспрессией маркеров $CD45^{dim}CD34^{+}$ в пробе и относительно уровня общих лейкоцитов в периферической крови пациента (**L**), по формулам: $D4=(L \times C4)/100$, $D5=(L \times C5)/100$.

По каждому из перечисленных параметров определены пороговые значения, представленные в таблице 5.5. Диагностические пороговые значения по каждому показателю получены в результате апробации изобретения у здоровых доноров ($n=50$) и у больных с ожогами ($n=240$), и проведения 4840 анализов с их статистической обработкой.

При получении значений $C1 \geq 0,03$, $C2 \geq 0,02$ и/или $C3 \geq 0,01$, $C4 \geq 72$ и/или $C5 \leq 28$, $D1 \geq 0,003$, $D2 \geq 0,002$ и/или $D3 \geq 0,001$, $3,2 \leq D4 \leq 8,5$ и/или $1,3 \leq D5 \leq 3,3$ делают вывод о высоком системном регенераторном потенциале у ожоговых больных, а условия для аутодермопластики считают благоприятными.

При получении значений $C1 < 0,03$, $C2 < 0,02$ и/или $C3 < 0,01$, $C4 < 72$ и/или $C5 > 28$, $D1 < 0,003$, $D2 < 0,002$ и/или $D3 < 0,001$, $D4 < 3,2$ и/или $D5 < 1,3$, делают вывод о низком системном регенераторном потенциале у ожоговых больных, а условия для аутодермопластики считают неблагоприятными.

Таблица 5.5. Пороговые значения параметров для оценки системного регенераторного потенциала у ожоговых больных

Параметр	Единицы измерения	Пороговое значение
C1	%	0,03
C2	%	0,02
C3	%	0,01
C4	%	72
C5	%	28
D1	$10^9/\text{л}$	0,003
D2	$10^9/\text{л}$	0,002
D3	$10^9/\text{л}$	0,001
D4	$10^9/\text{л}$	3,2 – 8,5
D5	$10^9/\text{л}$	1,3 – 3,3

Заявленный способ продемонстрировал высокую степень достоверности, процент ошибки составил не более 7%, а точность достигала 93%.

Способ многопараметрического анализа субпопуляций гемопоэтических стволовых клеток позволяет наиболее полно оценить системный регенераторный потенциал у пациента на этапах комплексного лечения ожоговой болезни и служит одним из важнейших и объективных критериев в выборе персонифицированной тактики хирургического лечения по восстановлению кожного покрова. Динамическое исследование показателей регенераторного потенциала у больных с ожогами также даёт

возможность оценить эффективность лечения по пластическому закрытию ран.

5.4.1. Клинический пример №1

Пациент Ц., 36 лет с ожогом пламенем волосистой части головы, лица, туловища, верхних и нижних конечностей II-III ст. 40% п.т (III ст. – 16% п.т.), термоингаляционной травмой был госпитализирован в реанимацию ожогового центра ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России. Тяжесть состояния обусловлена ожоговой болезнью, в стадии септикотоксемии, осложнённой инвазивной раневой инфекцией. Продолжена целенаправленная антимикробная терапия, комплексная интенсивная терапия, для продолжения эффективного хирургического лечения выполнялись перевязки под общей анестезией. На 24-е сутки после травмы раны в области туловища, верхних и нижних конечностей на большей площади представлены сухим коричневым струпом с участками нагноения и отторжения на площади 25% п.т. При этом показатели регенераторного потенциала на уровне жизнеспособных клеток, представленные на рисунке 5.12 и в таблице 5.6, составили: общие ГСК $CD45^{dim}CD34^{+}$ (C1) - 0,12%, зрелые ГСК $CD45^{dim}CD34^{+}CD38^{+}$ (C2) - 0,09%, незрелые ГСК $CD45^{dim}CD34^{+}CD38^{-}$ (C3) - 0,04%, что оказалось достоверно выше ($p < 0,05$) пороговых значений в 4,0 в 4,5 и в 4,0 раза соответственно.

Процентное соотношение жизнеспособных зрелых и незрелых субпопуляций ГСК в популяции жизнеспособных общих ГСК $CD45^{dim}CD34^{+}$ не выходило за пределы пороговых значений и составило C4 72 %, C5 28 % (таблица 5.6), что свидетельствовало о высоком системном регенераторном потенциале и благоприятных условиях для проведения оперативного лечения.

Проведена хирургическая некрэктомия ожогового струпа туловища, верхних и нижних конечностей 15% поверхности тела, ксенопластика 15% поверхности тела. Дальнейшее лечение пациента продолжено в условиях

отделения реанимации. На фоне комплексного лечения инфекционная интоксикация регрессировала.

На 50-е сутки после травмы сохраняется высокая активность системного регенераторного потенциала по всем параметрам (рис. 5.13, таблица 5.6).

При этом раны в области задней поверхности туловища и задней поверхности правой и левой нижних конечностей представлены участками третичного некроза с положительной динамикой в виде начала гранулирования ран. В области обеих кистей, лучезапястных суставов определяются гранулирующие раны. В области лица раны с активной эпителизацией. На 58-е сутки после травмы успешно выполнена хирургическая обработка и аутодермопластика гранулирующих ран туловища, левой верхней конечности и нижних конечностей 10% п.т.

За время наблюдения и комплексного лечения пересаженные аутодермотрансплантаты на большей площади прижили, разрослись. В области проксимальных фаланг III, IV, V пальцев правой кисти определялось частичное выстояние дистального конца проксимальных фаланг с гнойным артритом. На 87 –е сутки после травмы выполнена ампутация IV, V пальца правой руки на уровне основных фаланг с пластикой местными тканями. Хирургическая обработка и аутодермопластика гранулирующих ран правой и левой кисти 0,1% п.т.

Перед выпиской пациента на 94–е сутки после травмы сохраняется удовлетворительный регенераторный потенциал на уровне всех пороговых показателей формулы (рис. 5.14, таблица 5.6), что сопровождалось восстановлением целостности кожного покрова тяжелообожженного пациента.

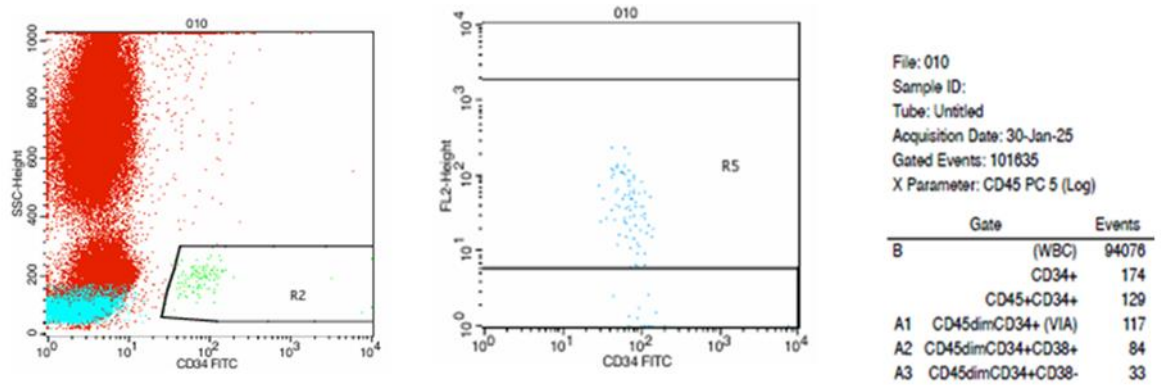


Рис. 5.12. Dot Plot при высоком системном регенераторном потенциале у пациента Ц., на 24-е сутки после ожоговой травмы (проточная цитометрия)

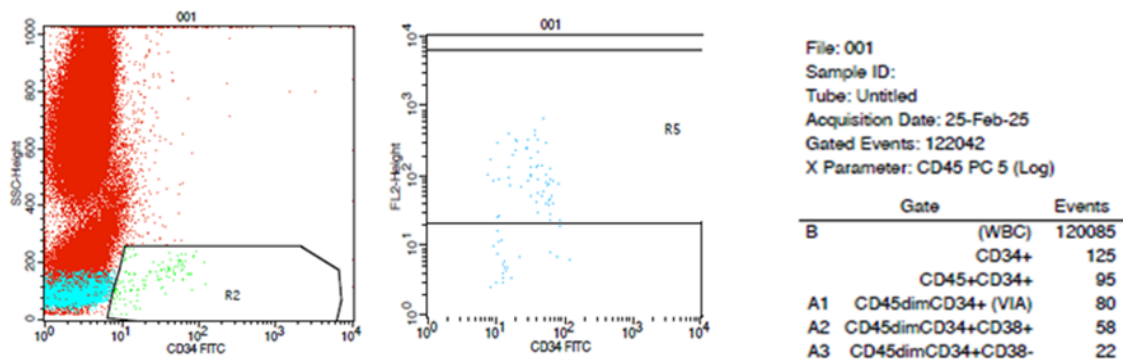


Рис. 5.13. Dot Plot при высоком системном регенераторном потенциале у пациента Ц., на 50-е сутки после ожоговой травмы (проточная цитометрия)

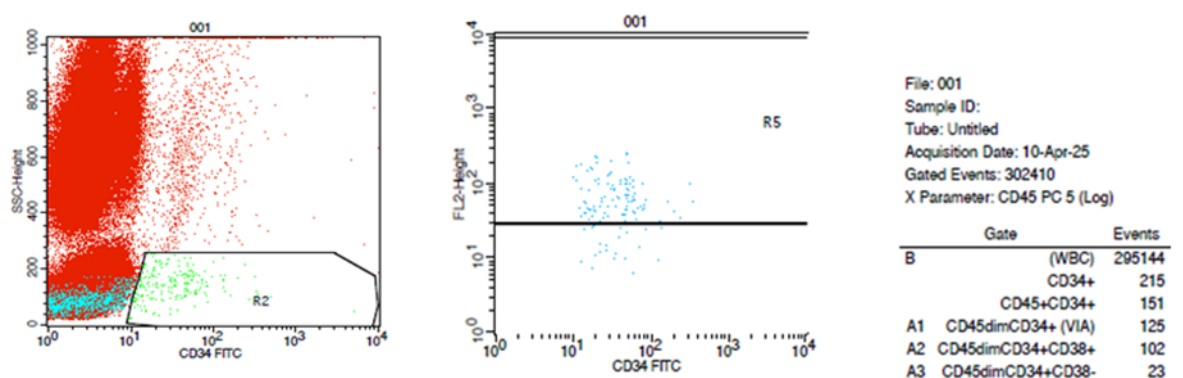


Рис. 5.14. Dot Plot при высоком системном регенераторном потенциале у пациента Ц., на 94-е сутки после ожоговой травмы (проточная цитометрия)

Таблица 5.6. Результаты оценки системного регенераторного потенциала у пациента Ц. в динамике

Пациент Ц.	Ед. изм.	24 сутки п.т.	50 сутки п.т.	94 сутки п.т.
L (лейкоциты в периферической крови)	10⁹/л	10,900	11,680	7,500
B (белые клетки крови в пробе)	Events	94076,000	120085,000	295144,000
A1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	Events	117,000	80,000	125,000
C1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,124	0,067	0,042
A2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺)	Events	84,000	58,000	102,000
C2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,089	0,048	0,035
A3 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻)	Events	33,000	22,000	23,000
C3 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,035	0,005	0,008
C 4 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	%	72,000	72,500	81,600
C 5 (жизнеспособные " не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	%	28,000	27,500	18,400
D1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,014	0,008	0,003
D2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,010	0,006	0,003
D3 жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,004	0,001	0,001
D4 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	7,848	8,468	6,120
D5 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	3,052	3,212	1,380

5.4.2. Клинический пример №2

У пациента Б., 34 года, с ожогами пламенем волосистой части головы, лица, туловища, верхних и нижних конечностей II-III ст. 62% п.т (III ст. – 37% п.т.) ожоговые раны представлены в виде дезэпителизированных поверхностей с участками красного, а на большей площади серого и коричневого струпа с гнойным отделяемым и перифокальным воспалением вокруг. В связи с циркулярным расположением глубокого струпа в области туловища выполнены некротомические разрезы по боковым поверхностям в области ожогового струпа туловища. Течение ожоговой болезни осложнилось развитием сепсиса на 9-е сутки после травмы. Вследствие

интенсивного комплексного лечения к 23-м суткам после травмы по клинико-лабораторным данным признаки сепсиса редуцируют, отмечается разрешение органной дисфункции и инфекционной интоксикации.

Однако анализ системного регенераторного потенциала выявил его существенное снижение, что подтверждалось как визуально на проточном цитометре по Dot Plot (рис. 5.15), так и количественно по ключевым показателям расчета системного регенераторного потенциала: значения $C1 < 0,03$, $C2 < 0,02$, $C3 < 0,01$, $C4 < 72$, $C5 > 28$, $D1 < 0,003$, $D2 < 0,002$, $D3 < 0,001$ (таблица 5.7).

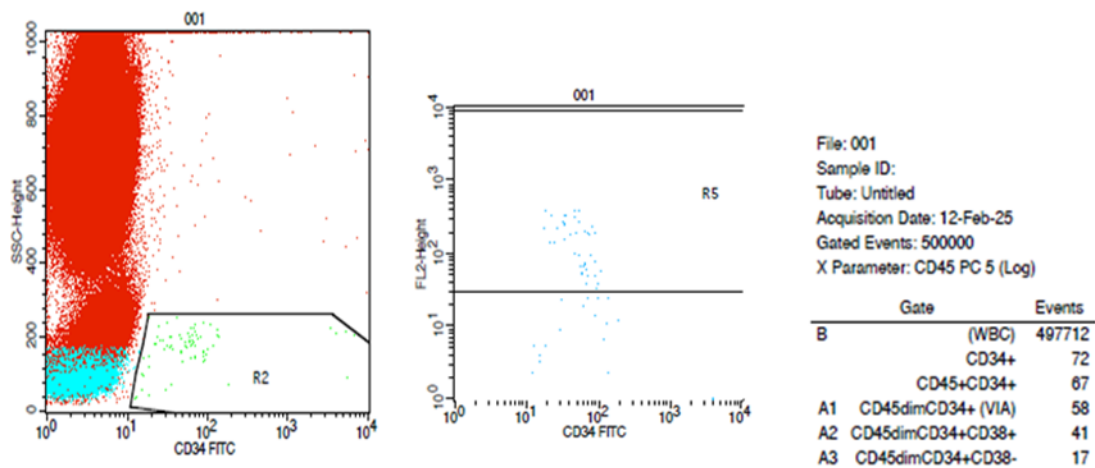


Рис. 5.15. Dot Plot при низком системном регенераторном потенциале у пациента Б., на 23-е сутки после ожоговой травмы (проточная цитометрия)

Таблица 5.7. Результаты оценки системного регенераторного потенциала у пациента Б. в динамике

Пациент Б.	Ед. изм.	23 сутки п.т.	51 сутки п.т.
L (лейкоциты в периферической крови)	10⁹/л	11,9	6,7
B (белые клетки крови в пробе)	Events	497712	324963
A1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	Events	58	92
C1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,01	0,03
A2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺)	Events	41	60
C2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,01	0,02
A3 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻)	Events	17	32
C3 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,003	0,01
C 4 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	%	70,7	65,2
C 5 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	%	29,3	34,8
D1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,001	0,002
D2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,001	0,001
D3 жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,000	0,001
D4 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	8,4	4,4
D5 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	3,5	2,3

Принимая во внимание особенности течения раневого процесса, а также площадь травматического воздействия при оперативном вмешательстве на фоне низкого системного регенераторного потенциала пациента - принято решение воздержаться от проведения аутодермопластики и продолжить дальнейшее комплексное лечение и наблюдение в условиях отделения реанимации. Больному проводилось активное хирургическое лечение раневого процесса с выполнением расширенных перевязок, этапных некрэктомий ожоговых ран и ксенопластики.

К 51-м суткам после травмы отмечена положительная динамика регенераторного потенциала с восстановлением до порогового уровня, соответствующего высокому системному регенераторному потенциалу по показателям: $C1=0,03$, $C2=0,02$, $C3=0,01$, $D3=0,001$, $D4 \geq 3,2$ и $\leq 8,5$, $D5 \geq 1,3$ и $\leq 3,3$ (таблица 5.7).

При этом гранулирующие раны туловища, верхних и нижних конечностей со скудным серозным отделяемым, объективно подготовлены к пластическому закрытию, в связи с чем, выполнена хирургическая обработка и аутодермопластика ожоговых ран туловища, верхних и нижних конечностей 10% поверхности тела с удовлетворительным приживлением и эпителизацией аутодермотрансплантатов.

В последующем удалось успешно восстановить целостность кожного покрова пациента на фоне нормализации системного регенераторного потенциала. На рисунке 5.16 и таблице 5.8 представлены результаты по анализу пациента на 84-е сутки после травмы, перед выпиской из ожогового центра. Значения параметров $C1 \geq 0,03$, $C2 \geq 0,02$, $C3=0,01$, $C4 \geq 72$, $C5 \leq 28$, $D4 \geq 3,2$ и $\leq 8,5$, $D5 = 1,3$ - соответствуют высокому системному регенераторному потенциалу.

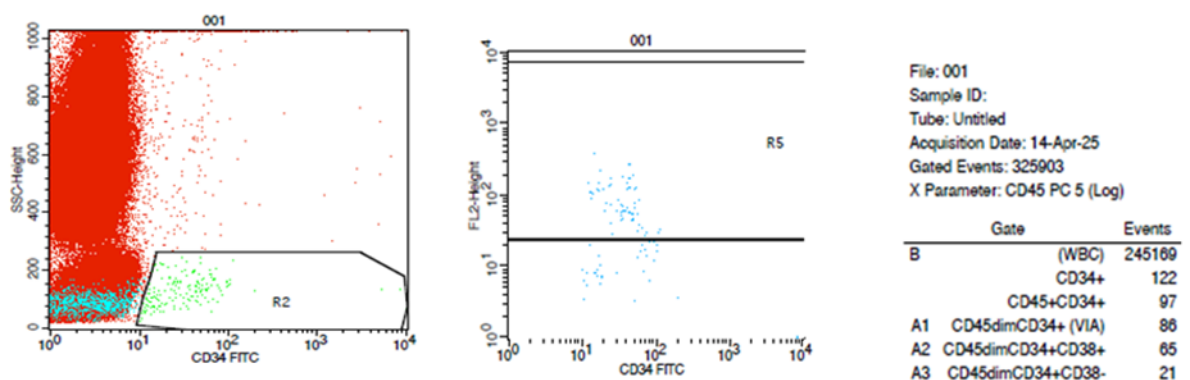


Рис. 5.16. Dot Plot при высоком системном регенераторном потенциале у пациента Б, на 84-е сутки после ожоговой травмы (проточная цитометрия)

Таблица 5.8. Результаты оценки системного регенераторного потенциала у пациента Б. на 84-е сутки после травмы

Пациент Б.	Ед. изм.	Результат
L (лейкоциты в периферической крови)	10⁹/л	5,2
B (белые клетки крови в пробе)	Events	245169
A1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	Events	86
C1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,04
A2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺)	Events	65
C2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,03
A3 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻)	Events	21
C3 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в общем количестве белых клеток крови в пробе)	%	0,01
C 4 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	%	75,6
C 5 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺)	%	24,4
D1 (жизнеспособные общие ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,002
D2 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,001
D3 жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в общем количестве белых клеток крови в пробе относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	0,000
D4 (жизнеспособные "зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁺ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	3,9
D5 (жизнеспособные "не зрелые" ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD38 ⁻ в популяции жизнеспособных общих ГСК CD45 ^{dim} CD34 ⁺ относительно уровня лейкоцитов периферической крови)	10⁹/л	1,3

Таким образом, важными составляющими успешного комплексного лечения больных с обширными глубокими ожогами является оценка состояния обожженных больных на основе комплексного анализа иммунного статуса и регенераторного потенциала. Это дает возможность не только контролировать течение ожоговой болезни и прогнозировать риск развития осложнений, но и эффективно применять хирургическую тактику по пластическому закрытию ожоговых ран.

Глава 6. КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С ОБШИРНЫМИ ОЖОГАМИ И СЕПТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА «ГАБРИГЛОБИН-IgG» ДЛЯ ИММУНОЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Как показано в предыдущих исследованиях, важным фактором развития тяжелой инфекции у тяжелообожженных являются послеожоговая иммуносупрессия и иммунная гиперактивация, сопряженная с воспалительной реакцией, вызывающие стойкие изменения иммунной системы организма. Наиболее перспективным в нормализации или коррекции иммунной дисфункции при осложненном течении ожоговой болезни является применение иммунозаместительной терапии препаратами иммуноглобулинов с содержанием высокого уровня нерасщепленного IgG.

«Габриглобин-IgG» - отечественный нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения, произведенный по инновационной технологии с содержанием до 99% мономерного IgG с нерасщепленной структурой.

Изучена клинико-иммунологическая эффективность применения Габриглобина для профилактики и лечения сепсиса у 50 пациентов с общей площадью термического поражения более 30% поверхности тела и ожоговой болезнью в стадии ожоговой токсемии и септикотоксемии.

Основная группа «профилактика сепсиса» - 15 пациентов получили «Габриглобин-IgG» в дозе по 50 мл. (2,5 г.) в\в ежедневно, курс 5 дней - суммарная доза 250 мл (12,5 г), а основная группа «лечение сепсиса» - 15 пациентов получили 10-дневный курс внутривенных инфузий по 50 мл (2,5 г.) ежедневно с общим объемом полученного препарата 500 мл (25 г). В соответствующие группы контроля «профилактики» и «лечения» сепсиса вошло по 10 больных без включения в комплексную терапию габриглобина.

Пациенты всех групп были сходны по диагнозу, полу и возрасту. Результаты иммунологических исследований пациентов проанализированы в

исходный период, через 5 и 10 суток от начала лечения, а клинико–лабораторные исследования (биохимический, гематологический, бактериологический анализы, изучение острофазовых реактантов) – в более частые сроки лечения.

Критериями эффективности препарата Габриглобин служили: динамика клинической картины ожоговой болезни, изменений иммунограммы и лабораторных параметров, частота развития осложнений и уровень летальности.

6.1. Эффективность иммунозаместительной терапии Габриглобином при профилактике сепсиса у больных с обширными ожогами

В иммунограмме у обожженных пациентов в группе профилактики генерализации инфекции в исходный период до использования Габриглобина отмечалось возрастание лейкоцитоза со сдвигом лейкоформулы влево до юных форм и палочкоядерных нейтрофилов. Медиана (Me) относительной лимфопении составила - 11,3%, повышение гранулоцитов с экспрессией маркера CD64⁺ варьировало от 34% до 99,8% (Me - 72,4%). У 93 % больных, наблюдалось резкое снижение сывороточного уровня иммуноглобулина IgG (Me - 3,2 г/л) при активации кислородного метаболизма фагоцитов до 19,35 – 40 мВ/100 (Me - 24,7 Мв/100 фагоцитов). Указанные негативные изменения иммунного статуса свидетельствовали о высоком риске развития генерализованного инфекционного осложнения. В процессе комплексного лечения с включением иммунозаместительной терапии габриглобином происходило снижение уровня лейкоцитов со средним значением в группе с Me - 11,83 до 8,38 млрд/л, а в контрольной группе сохранялся лейкоцитоз (соответственно Me - 12,87 и 10,42 млрд/л), причем в основной группе к 10 суткам среди всех больных было лишь 13% пациентов с лейкоцитозом, тогда как в контрольной в 3,1 раза больше – 40% (рис. 6.1). В сравнении с исходным периодом также достоверное снижение % больных с лейкоцитозом

(с 33% до 13%) произошло к 10 суткам лечения, тогда как процент больных в группе контроля не изменился.

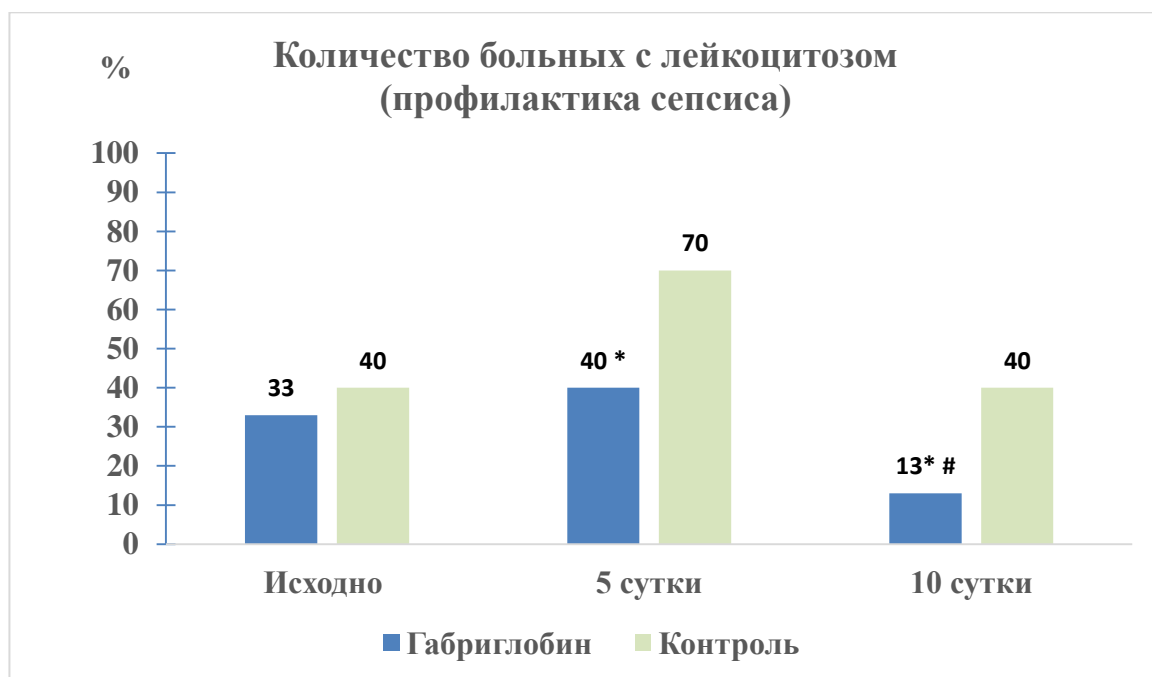


Рис. 6.1. Влияние Габриглобина на уровень лейкоцитов у ожоговых больных при профилактике сепсиса

Примечание:

*- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами

- достоверные ($p < 0,05$) различия между исходным периодом и 10 сутками

Габриглобин так же вызвал более быстрое купирование нейтрофильного сдвига влево с Ме - 9,6% до Ме - 5,8% ($p < 0,05$), в контроле он практически не изменился, составляя соответственно Ме - 12,27% и Ме - 10,83%. Причем в основной группе количество больных со сдвигом формулы крови в процессе лечения достоверно снижалось и к 10–м суткам составило 40% против 80% и оказалось также в 2 раза ниже, чем до использования Габриглобина (рис. 6.2).

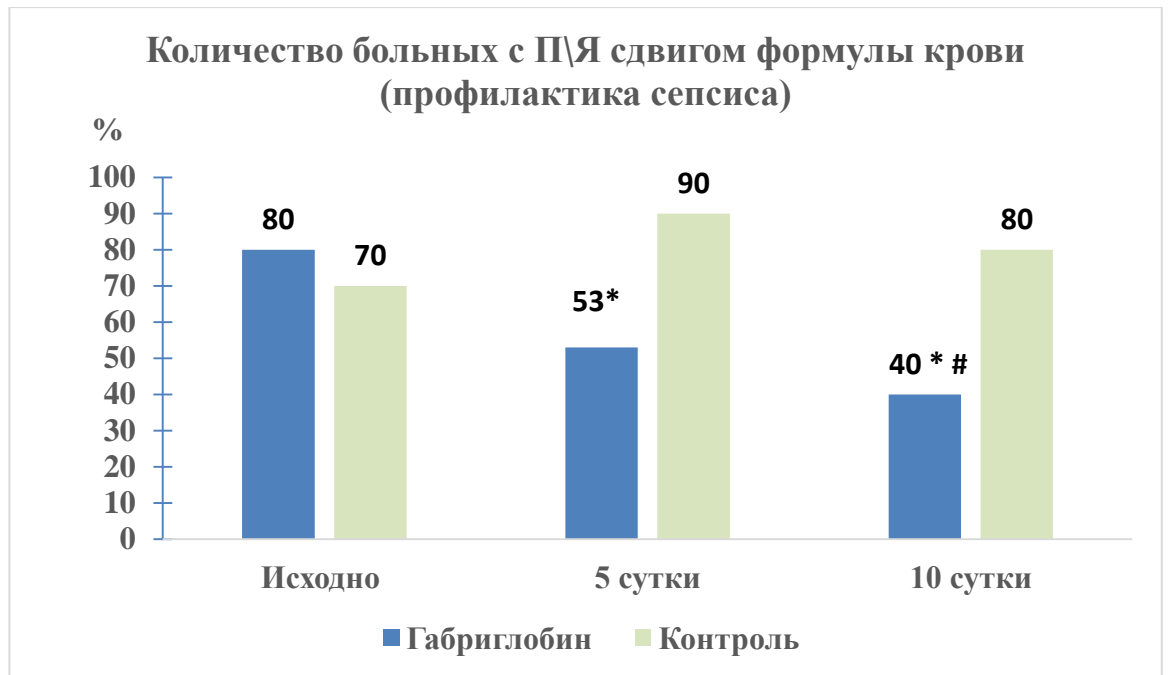


Рис. 6.2. Влияние Габриглобина на уровень П\Я лейкоцитов у ожоговых больных при профилактике сепсиса

Примечание:

*- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами

- достоверные ($p < 0,05$) различия между исходным периодом и 10 сутками

При использовании Габриглобина к 10-м суткам происходило достоверное снижение среднего значения гранулоцитов с экспрессией «септического» маркера $CD64^+$ с 72,4% до 49,3% ($p < 0,05$), а в группе без применения Габриглобина среднее значение $CD64^+$ гранулоцитов оставалось в эти же сроки высоким, соответственно: исходно Ме - 50,0%, на 10-е сутки Ме - 60,1% (рис. 6.3).

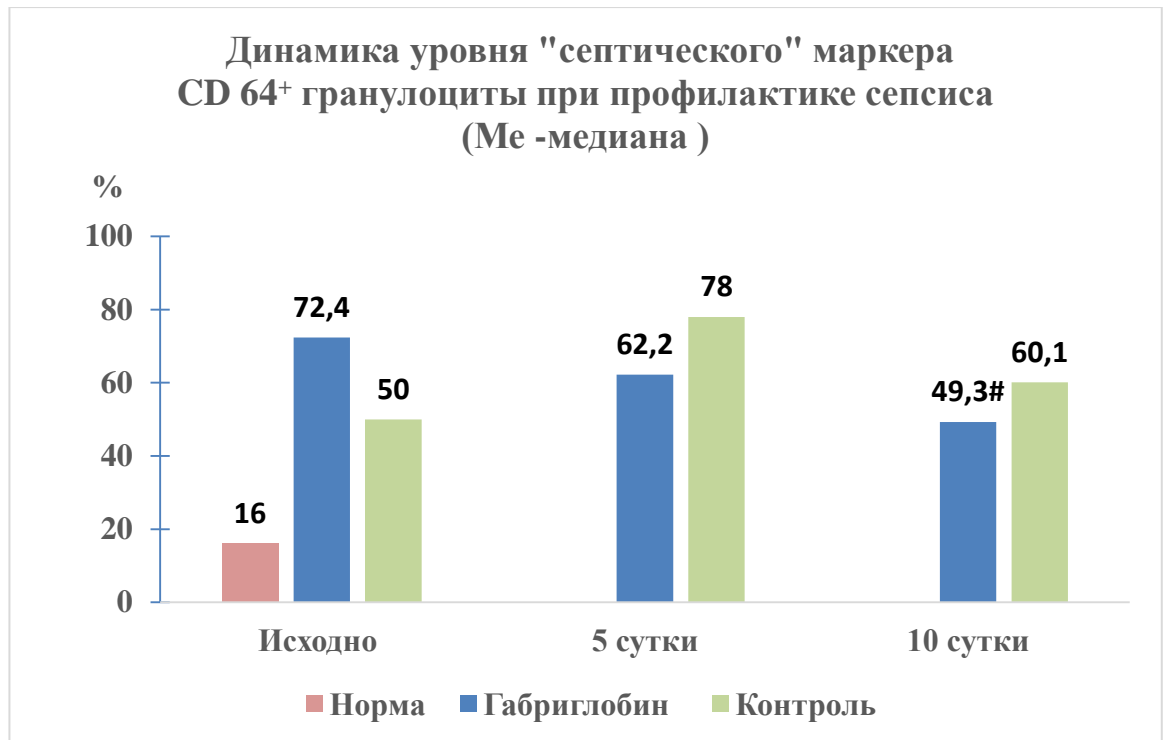


Рис. 6.3. Влияние Габриглобина на уровень «септического» маркера CD64⁺ гранулоциты у ожоговых больных при профилактике сепсиса

Примечание: * - достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Число больных с повышенным уровнем CD64⁺ гранулоцитов при профилактике сепсиса габриглобином в контрольной группе сохранялось на всем протяжении срока исследования, а к 5-м суткам достигло 100%. В тоже время число больных в основной группе с высоким содержанием CD64⁺ гранулоцитов уже на 5-е сутки стало в 1,7 раза меньше, чем в контроле (60% против 100%) и к 10-м суткам разница увеличилась до 2,4 раза 33% и 80% соответственно (рис. 6.4).

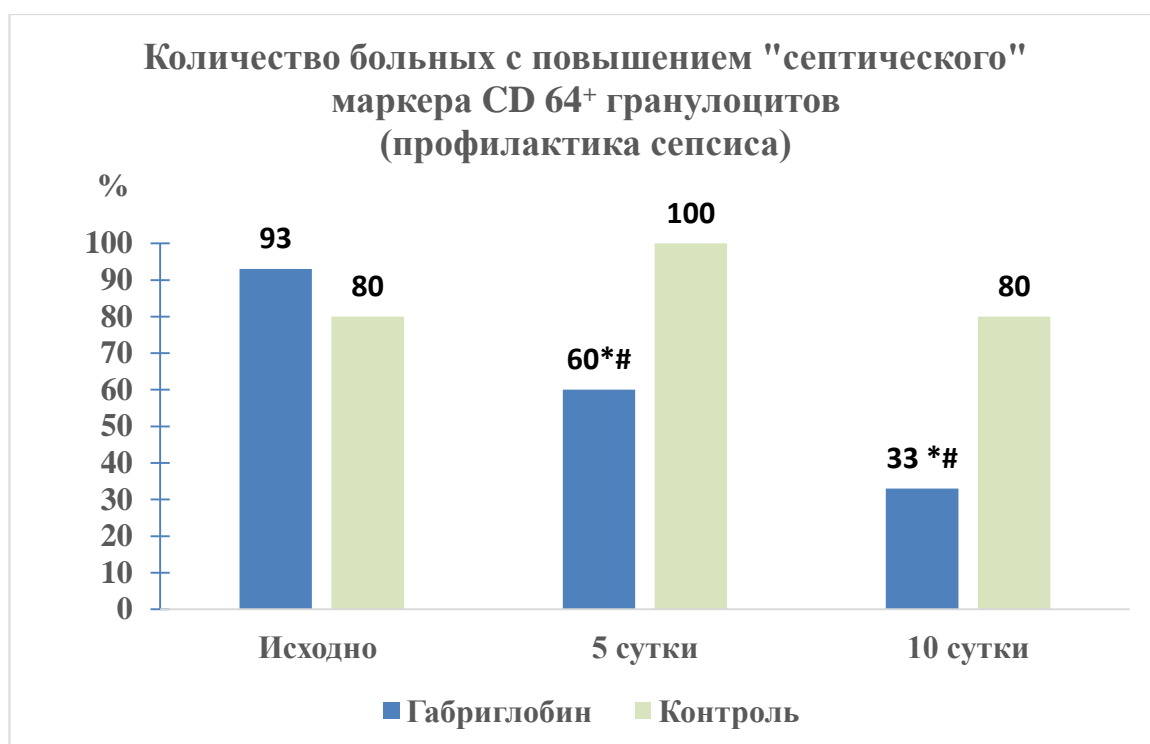


Рис. 6.4. Влияние Габриглобина на уровень «септического» маркера CD64⁺ гранулоциты у ожоговых больных при профилактике сепсиса

Примечание: * - достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

В группе с профилактикой генерализации инфекции при применении габриглобина также отмечено значительное снижение маркеров гиперактивации иммунной системы в сравнении с группой контроля, в которой пациенты не получали иммунозаместительную терапию габриглобином. На 10–е сутки от начала терапии в основной группе было 40% больных с повышенным содержанием Т–лимфоцитов с экспрессией активационного антигена HLA–DR⁺, тогда как в группе без габриглобина к этому сроку их оказалось в 2 раза больше - 80%.

Аналогична была динамика и уровня ко-стимулирующих молекул CD70, члена семейства фактора некроза опухоли, участвующих в адаптивных реакциях Т-клеток и стимуляции врождённого иммунитета. С повышенными значениями CD70⁺ нейтрофилов процент больных к 10-м суткам в основной

группе значительно снижался, когда как в группе контроля наоборот возрастал и составил 33% и 90% соответственно (рис. 6.5).

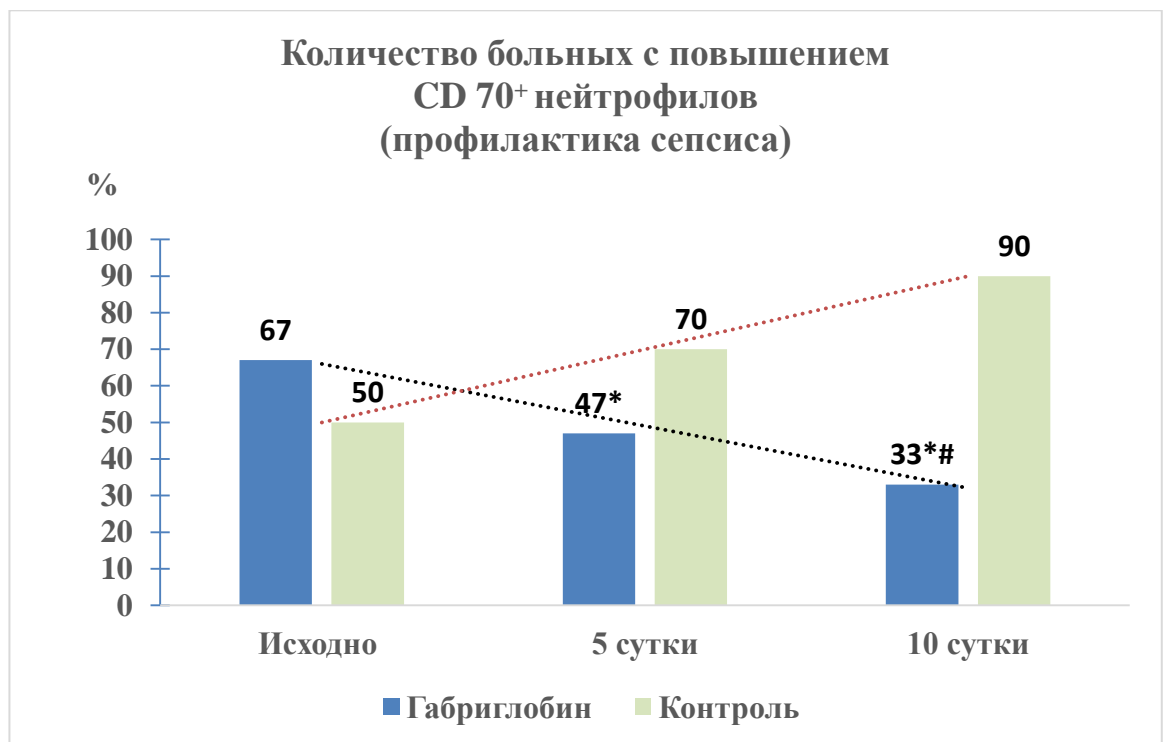


Рис. 6.5. Влияние Габриглобина на снижение маркера гиперактивации иммунной системы CD70⁺ у ожоговых больных при профилактике сепсиса

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Вместе с тем содержание лимфоцитов с экспрессией рецепторов ИЛ–2 (CD25⁺ клетки), которые отражают активацию иммунной системы по Th1–клеточному типу и, по–видимому, могут рассматриваться как позитивная компенсаторная реакция антимикробной защиты в условиях дефицита гуморальной системы, также оказалось повышенным у 33% больных, получавших габриглобин, в сравнении с контрольной группой больных без иммунотерапии, где таких пациентов было лишь 10%.

Применение Габриглобина для профилактики сепсиса сопровождалось нормализацией или купированием дефицита ряда иммунных параметров.

Низкий уровень иммуноглобулина IgG у пациентов в контрольной группе профилактики генерализации инфекции в исходный период и в конце наблюдения отмечался у 40% и 30% больных, тогда как в исходный период у больных основной группы он регистрировался у 93%, а после курса Габриглобина полностью восстановился у всех больных (рис. 6.6).

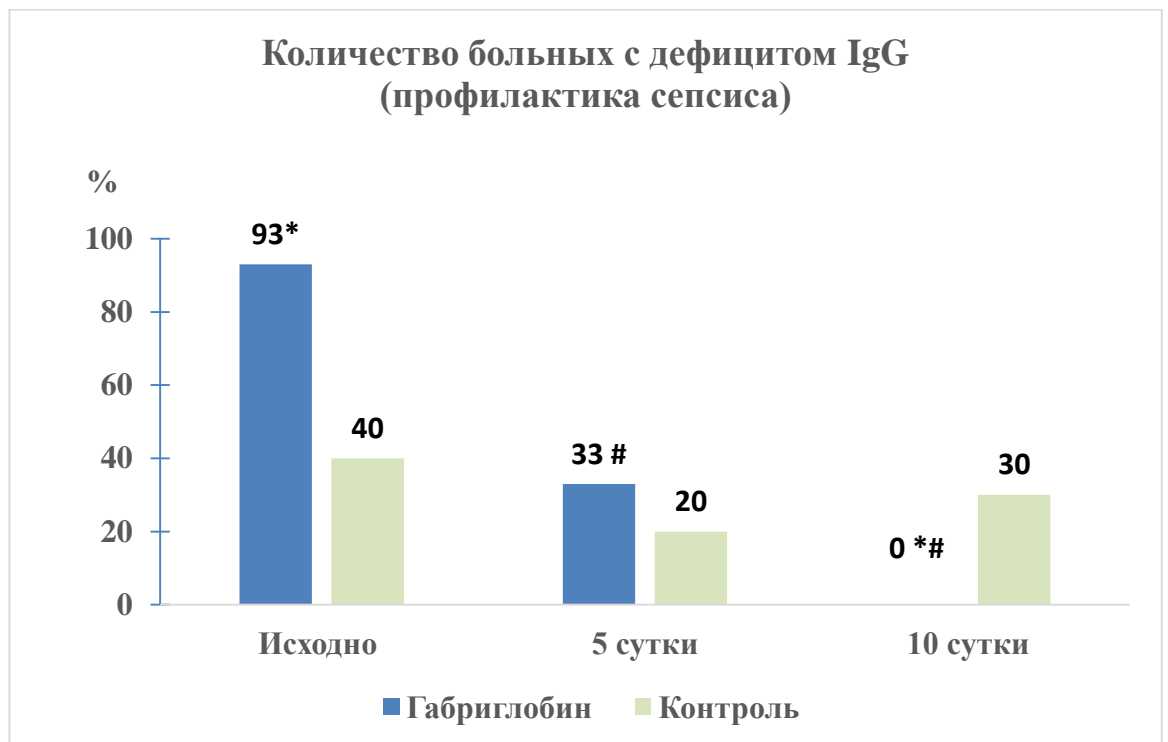


Рис. 6.6. Влияние Габриглобина на восстановление дефицита иммуноглобулина IgG у ожоговых больных при профилактике сепсиса
 Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Более того, если дефицит естественных киллеров (NK-клеток) в группе профилактики получавшей Габриглобин достоверно купировался, то в контрольной группе без иммунотерапии он сохранялся без существенной положительной динамики (рис. 6.7).

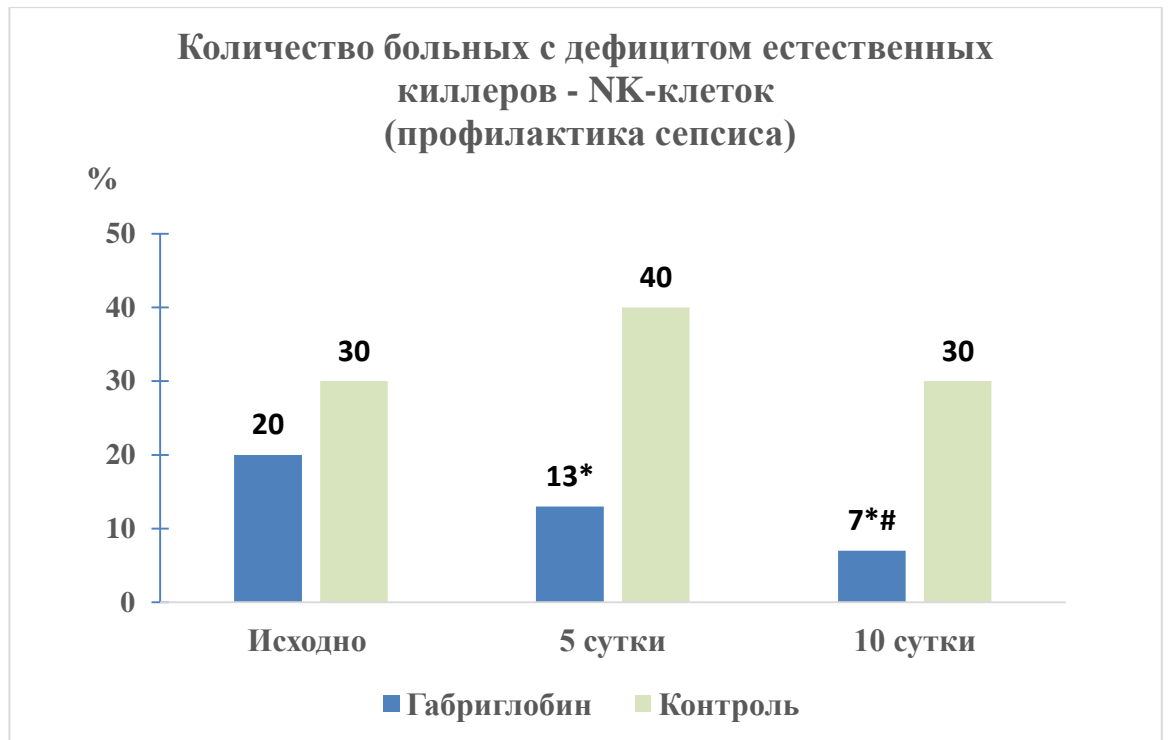


Рис. 6.7. Влияние Габриглобина на восстановление дефицита НК- клеток у ожоговых больных при профилактике сепсиса

Примечание: * - достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Представленные результаты показывают высокую иммунологическую эффективность иммунозаместительной терапии Габриглобина с восстановлением дефицита гуморального иммунного звена и влиянием на купирование гиперактивации иммунной системы и эндогенной интоксикации у больных с обширными ожогами при высоком риске генерализации инфекции с целью профилактики сепсиса.

6.2. Эффективность иммунозаместительной терапии Габриглобином при лечении сепсиса у больных с обширными ожогами

При анализе иммунного статуса в исходный период у всех больных с ожоговым сепсисом наблюдались резкий лейкоцитоз от 13,2 до 23,8 млрд/л (Ме - 15,5 млрд/л) и палочкоядерный сдвиг формулы крови влево до 22,5%, повышение лейкоцитарного индекса эндогенной интоксикации ЛИИ в 3–8 раз выше нормы. В основной группе с лечением сепсиса габриглобином происходило быстрое уменьшение сдвига формулы крови влево и ЛИИ.

На рисунке 6.8. отчетливо видно снижение сдвига формулы крови влево по показателям нормализованного анализа содержания палочкоядерных гранулоцитов. Если в исходный период отмечено отсутствие больных с нормальным значением П\Я гранулоцитов у больных с сепсисом, то после проведенной терапии габриглобином число их возросло до 33%. В контрольной группе кинетика сдвига формулы крови была обратной – если в исходном периоде отмечалось 30% пациентов с нормальным содержанием палочкоядерных нейтрофилов, то к 10-м суткам у всех больных отмечался их повышенный уровень.



Рис. 6.8. Влияние Габриглобина на уровень П\Я лейкоцитов у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Снижение гиперактивации иммунной системы при использовании Габриглобина в лечении ожогового сепсиса выявлено на примере динамики содержания трех типов клеток (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты) с экспрессией активационного маркера $CD70^+$. Количество больных с высокой экспрессией $CD70^+$ достоверно снижалось при лечении сепсиса, тогда как в контрольной группе не выявлено существенной динамики в процессе наблюдения (рис. 6.9 (а,б,в)).

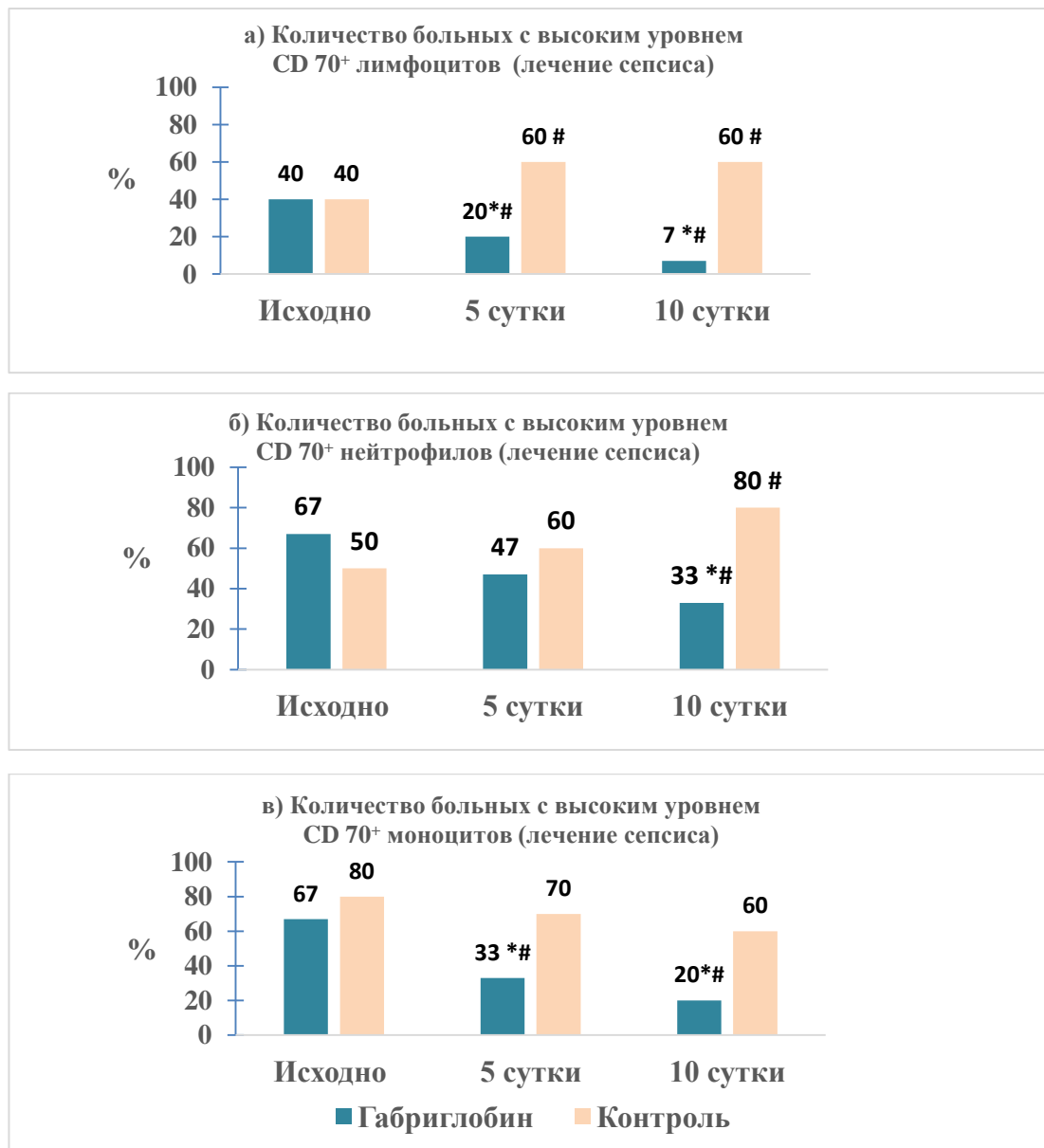


Рис. 6.9. (а,б,в). Влияние Габриглобина на снижение маркера гиперактивации иммунной системы $CD70^+$ на лимфоидных и фагоцитарных клетках у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Снижение гиперактивации иммунной системы отмечено и при анализе содержания гранулоцитов с экспрессией активационного «септического» маркера CD64⁺, содержание которого у здоровых людей составляет <16%. В основной группе у больных с ожоговым сепсисом высокий уровень CD64⁺ гранулоцитов (Me - 94,2%) после лечения габриглобином имел тенденцию к снижению (Me - 75%), тогда как в контрольной он был выше (Me - 88,7%) (рис. 6.10).

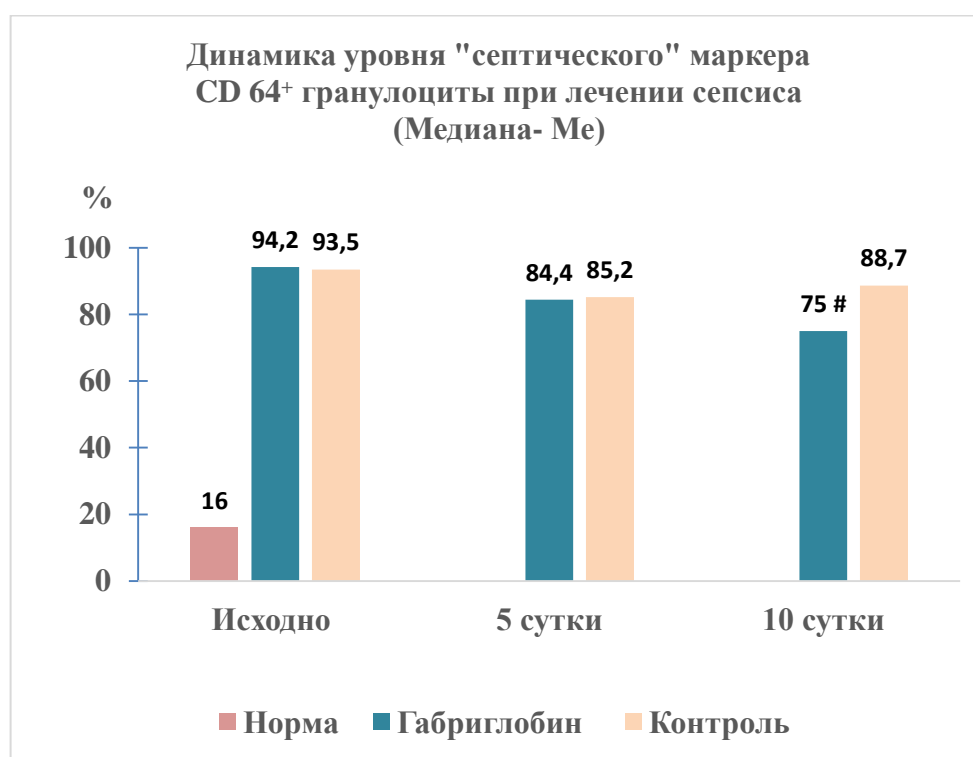


Рис. 6.10. Влияние Габриглобина на уровень «септического» маркера CD64⁺ гранулоциты у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Важно, что применение Габриглобина устраняло или нивелировало глубокий дефицит ряда иммунных параметров в сравнении с пациентами контрольной группы. У 67% больных основной группы наблюдалась глубокая относительная лимфопения (Me - 8%), которая у 30% больных сочеталась с абсолютной. После лечения Габриглобином лимфопения

сократилась в 2 раза и сохранилась лишь у 33% больных. У 61,5% пациентов произошла нормализация содержания лимфоцитов в отличие от контрольной группы, где у 75% пациентов сохранялась глубокая относительная лимфопения (рис. 6.11).

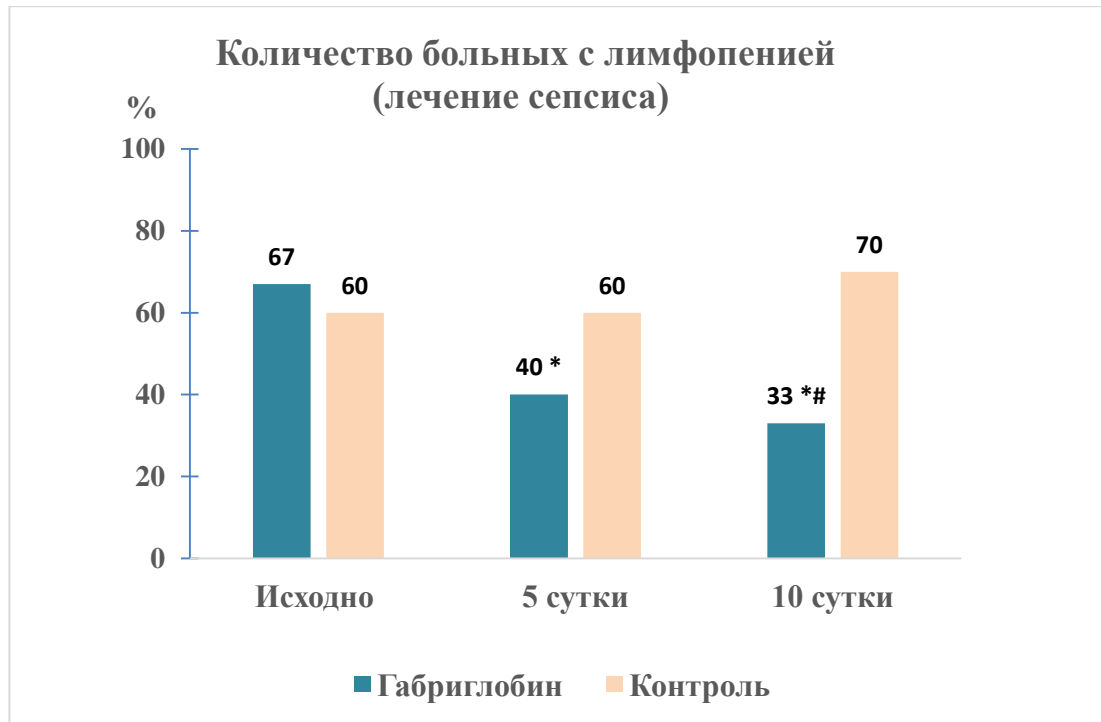


Рис. 6.11. Влияние Габриглобина на уровень относительной лимфопении у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: * - достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

В основной группе на фоне лечения с применением Габриглобина происходило резкое снижение числа пациентов с дефицитом естественных киллеров (NK- клеток), которых в контрольной группе было в 3,6 раза больше (рис. 6.12).

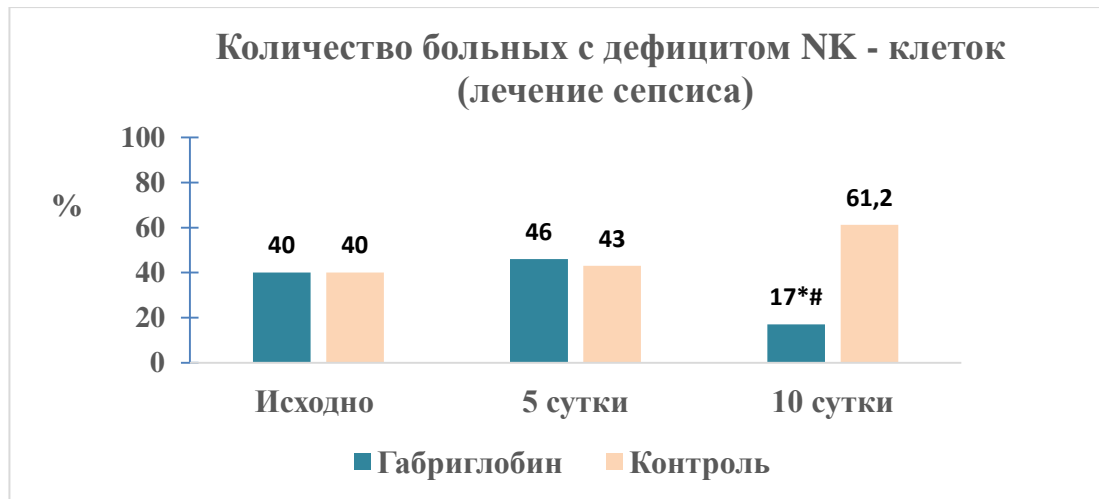


Рис. 6.12. Влияние Габриглобина на уровень естественных киллеров (NK-клеток) у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Более того, после применения Габриглобина резко снижалось число пациентов с глубоким дефицитом киллерных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$) вплоть до их полного исчезновения к 10 суткам после начала лечения, тогда как в контрольной группе таких больных было намного больше (рис. 6.13.).

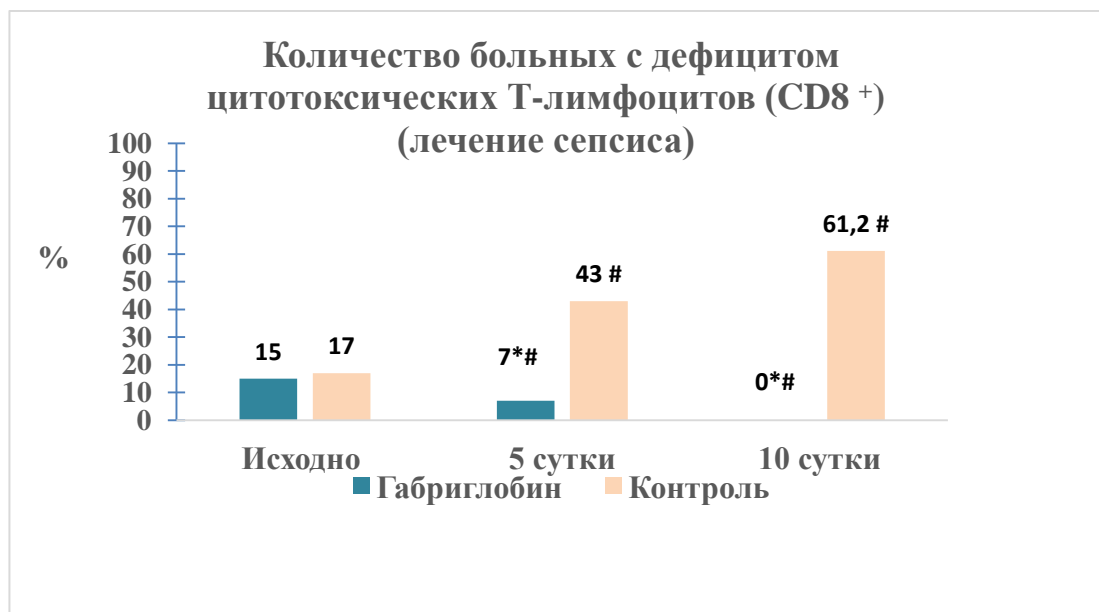


Рис. 6.13. Влияние Габриглобина на восстановление дефицита цитотоксических Т-лимфоцитов у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

В основной группе до начала введения габриглобина у 80% пациентов отмечался глубокий дефицит IgG (Me - 3,98 г/л). В то же время в контрольной группе подавление исходного уровня IgG отмечалось лишь у 14%, а к концу наблюдения оно регистрировалось уже у 43% пациентов (рис. 6.14).



Рис. 6.14. Влияние Габриглобина на восстановление дефицита иммуноглобулина IgG у ожоговых больных при лечении сепсиса

Примечание: * - достоверные ($p < 0,05$) различия между основной и контрольной группами; # - достоверные ($p < 0,05$) различия в сравнении с исходным периодом

Кинетика содержания IgG достоверно отличалась у пациентов основной и контрольной групп. Так, если в группе пациентов без Габриглобина гипои́ммуноглобули́немия IgG нарастала, то процент больных с дефицитом IgG в группе с применением иммуноглобулина достоверно снижался к 10 суткам (в 3,1 раза), несмотря что в исходный период число больных с дефицитом IgG в основной группе было намного выше, чем в контрольной (в 5,6 раза). Это свидетельствует о том, что применение Габриглобина приводит к быстрому восстановлению дефицита ключевого иммуноглобулина IgG и высокоэффективно для иммунозаместительной терапии у больных с обширными ожоговыми поражениями.

6.3. Клиническая эффективность Габриглобина при профилактике и лечении сепсиса у больных с обширными ожогами

Оценка клинической эффективности применения Габриглобина при профилактике и лечении сепсиса у больных с обширными ожогами проводилась по клинико-лабораторным критериям, включающих 9 параметров: изменение тяжести клинического состояния пациента, показателей температуры, лейкоцитоза, пульса и частоты дыхания, артериального давления, уровня общего белка, прокальцитонина и тромбоцитов. По полученным результатам определяли суммарную эффективность (хороший и удовлетворительный эффект) и отсутствие эффекта (таблица 6.1).

Таблица 6.1. Оценка клинической эффективности Габриглобина

№	Хороший эффект	Удовлетворит эффект	Нет эффекта
1	Снижение степени тяжести клинического состояния	Положительная динамика клинического состояния	Нет позитивных изменений
2	Нормализация температуры, если гектическая или интермиттирующая – снижение на $\geq 1^{\circ}\text{C}$	Снижение температуры до субфебрильной, если гектическая или интермиттирующая - то снижение $< 1^{\circ}\text{C}$	
3	Снижение лейкоцитоза $\geq 15\%$	Снижение лейкоцитоза $< 15\%$	
4	Снижение ЧД на $\geq 4/\text{мин}$	Снижение ЧД на $< 4/\text{мин}$	
5	Снижение ЧСС $> 10\%$ (от исходного)	Снижение ЧСС $< 10\%$ (от исходного)	
6	Увеличение АД $\geq 15\%$ или его стабилизация	Отсутствие стабилизации АД	
7	Нормализация или повышение тромбоцитов на 30%	Незначительный прирост тромбоцитов $< 30\%$ (от исходного)	
8	Увеличение общего белка крови не менее 5 г/л , но не от введения из вне	Увеличение протеинемии $< 5 \text{ г/л}$	
9	Динамика уровня прокальцитонина в сравнении с исходным	_____	

На рисунке 6.15. показана высокая суммарная эффективность габриглобина при лечении ожогового сепсиса, рассчитанная по проценту больных, имеющих «хороший и удовлетворительный эффект». Отмечена достоверная разница между основной и контрольной группами по 8 исследуемым клинико-лабораторным показателям, кроме АД: улучшение клинического состояния пациента - в 11,6 раз; температуры тела – в 6,9 раз; ЧДД - в 5,2 раза; ЧСС - в 1,9 раза, лейкоцитоза – в 4,2 раза; протеинемии – в 3,3 раза; тромбоцитемии - в 1,6 раза; уровня прокальцитонина – в 1,4 раза.

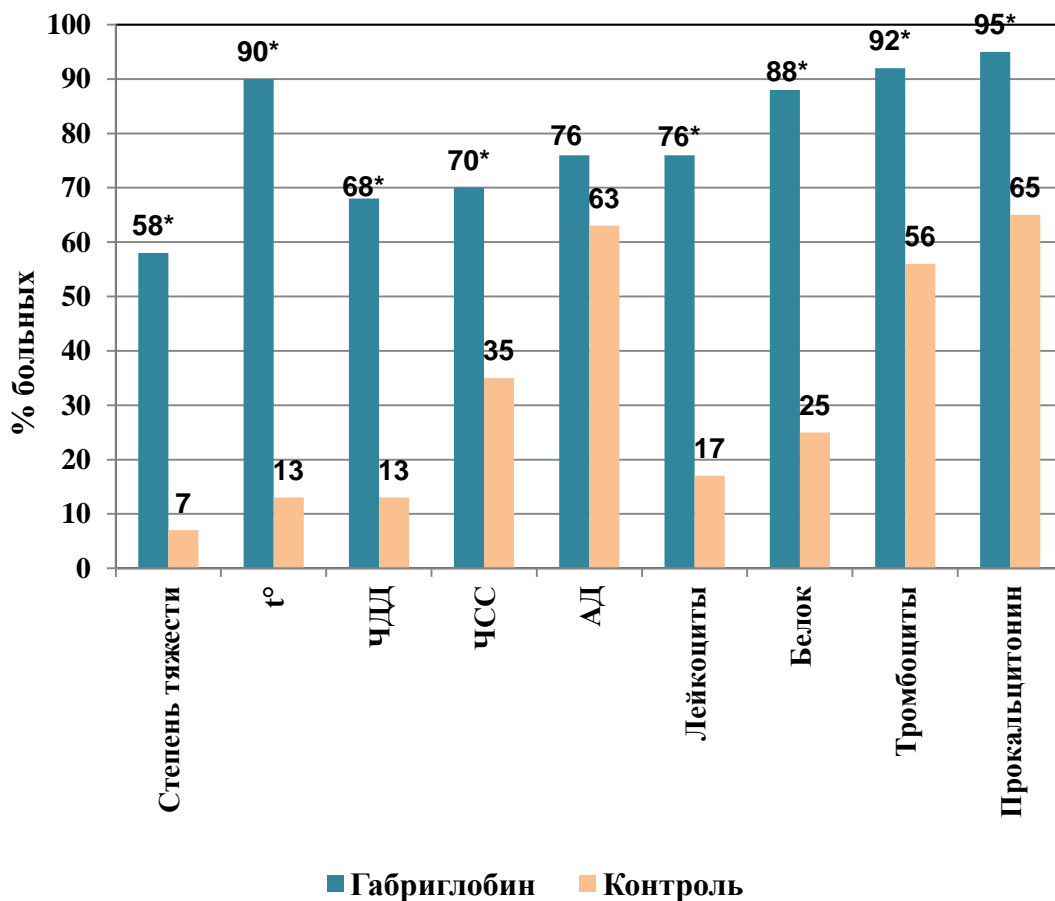


Рис. 6.15. Суммарная клиническая эффективность (хороший и удовлетворительный эффект) габриглобина при лечении сепсиса

***- достоверные различия относительно контрольной группы**

Таким образом положительный клинический эффект иммунотерапии габриглобином отмечен у 79% больных с сепсисом, тогда как при традиционном лечении без иммуноглобулина эффективность составила лишь 32%.

Достаточно близкие результаты получены при применении Габриглобина для профилактики генерализации инфекции (рис. 6.16). При оценке по исследуемым показателям клиническая эффективность в среднем составила 72% наблюдений (в контроле без габриглобина – 37%).

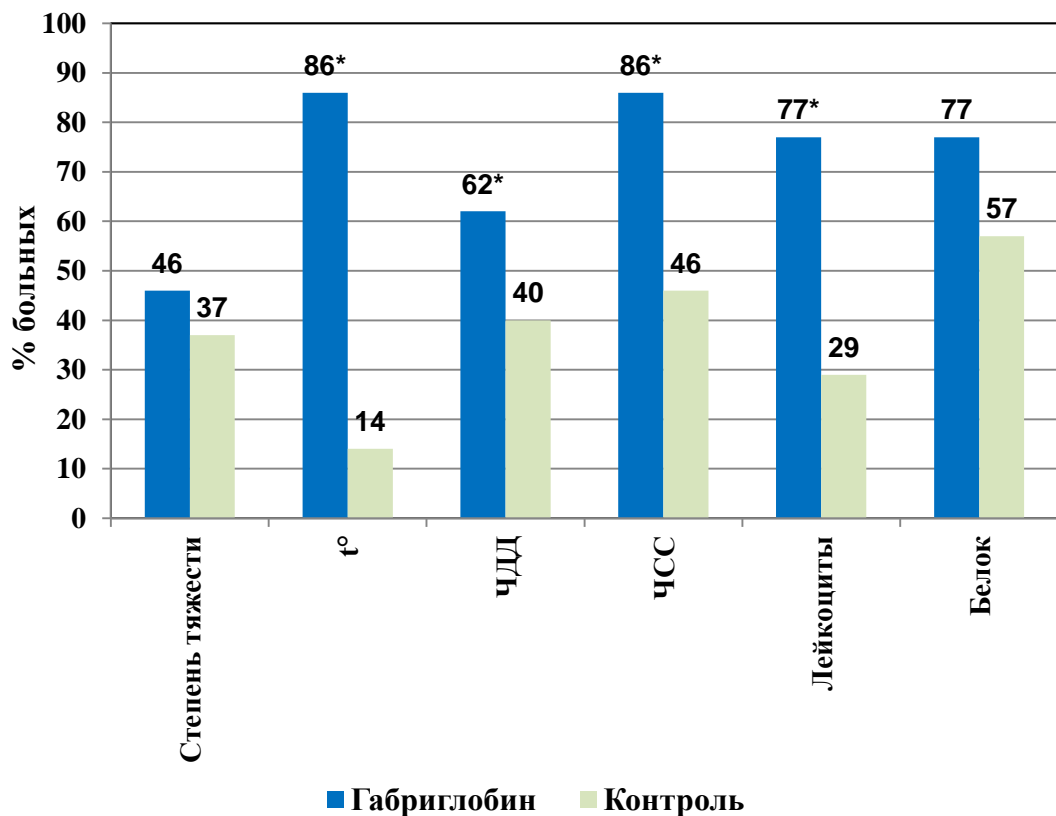


Рисунок 6.16. Суммарная клиническая эффективность (хороший и удовлетворительный эффект) габриглобина при профилактике сепсиса
 *- достоверные различия относительно контрольной группы

Таким образом, применение габриглобина для лечения сепсиса или профилактики генерализации инфекции у больных с ожогами, в сравнении с группой контроля без включения этого препарата, обеспечивает эффективное иммунозаместительное действие с быстрым восстановлением исходно низкого уровня иммуноглобулина IgG. При этом показано четкое иммуномодулирующее влияние препарата на целый ряд ключевых показателей иммунного статуса: снижение маркеров иммунной гиперактивации ($CD70^+$, $CD64^+$) и эндогенной интоксикации (лейкоциты, П/Я гранулоциты), а также купирование дефицита общих лимфоцитов, NK-клеток и Т-лимфоцитов.

Суммарная эффективность терапии габриглобином по клинико–лабораторным данным оказывается достаточно высокой. При профилактике ожогового сепсиса она составила в среднем 72 %, а при его лечении – в 79% наблюдений.

Глава 7. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ НА ОСНОВЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО АЛГОРИТМА ИММУНОКОРРЕКЦИИ

Проведены исследования по оценке эффективности комплексного лечения ожоговой болезни и ее осложнений с использованием персонализированной иммунокоррекции у тяжелообожженных на основе анализа иммунофенотипических маркеров лимфоидных и фагоцитарных клеток, которые ранее в работе не учитывались. В этой связи был расширен фенотипический анализ иммунного статуса пациентов за счет изучения перспективных маркеров, позволяющих всесторонне и функционально оценить индивидуальный характер нарушений иммунной системы у каждого пациента, что может оказаться очень важным и ценным не только для выбора тактики иммунокоррекции, но и для других видов патогенетической терапии ожоговой болезни и её осложнений.

Были подобраны маркеры с экспрессией HLA-DR⁺ антигенов ГКГС, субпопуляций естественных киллеров, Т-киллеров, Т-регуляторных лимфоцитов, клетки с экспрессией L-селектинов, адгезионных молекул, рецепторов комплемента, эндотоксинов бактерий и ЛПС, аналогов рецептора ФНО, а также общие лимфоциты, гранулоциты и моноциты с соответствующими фенотипическими маркерами, различные иммунные индексы, представляющие соотношения ключевых клеток иммунной системы.

Результаты показали, что в стадию острой ожоговой токсемии (3-10 день после ожоговой травмы) достоверно отмечено преимущественное возрастание содержания **лимфоцитов с экспрессией HLA-DR⁺ антигенов** ($p < 0,05$, относительно группы здоровых доноров) в среднем до 25%, максимально до 44,1%. В более поздние сроки ожоговой болезни уже у других 29% больных наблюдался дефицит HLA-DR⁺ ЛФ до 3,6% ($M = 5,97\%$).

В стадии ожоговой септикотоксемии, через 10-12 дней и более после травмы, у 18% больных возросло содержание активированных Т-лимфоцитов с экспрессией HLA-DR⁺ (CD3⁺HLA-DR⁺) до M= 60,8 %, это достоверно выше, чем содержание клеток у доноров (M= 24,5%).

Маркер CD3⁺HLA-DR⁺ нередко отражает позднюю гиперактивацию иммунной системы, коррелирует с интенсивностью иммунного ответа и может быть связан с хроническим воспалением. Следует отметить, что выявленное выше повышение данной субпопуляции Т-лимфоцитов часто происходило на фоне глубокого дефицита моноцитов, экспрессирующих аналогичный активационный маркер HLA-DR⁺ Мн, отражающего степень выраженности системной воспалительной реакции и, как показано в наших предыдущих исследованиях, высокий риск развития сепсиса. Причем у пациентов с критическими для жизни ожогами более 80% п.т. с сепсисом и летальным исходом данный показатель имел крайне низкий уровень: 10 - 25% (при норме >50%).

У 61,5% пациентов с обширными ожогами, не зависимо от стадии ожоговой болезни отмечено достоверное возрастание лимфоцитов с экспрессией адгезионных молекул ICAM-I (CD54⁺) с наибольшим отклонением числа клеток до 56,8% (норма 13%). Похожие изменения, но у меньшего числа больных касались повышения гранулоцитов CD54⁺, причем в некоторых случаях до очень высоких цифр - 81%, тогда как изменение моноцитарных клеток с экспрессией CD54⁺, напротив происходило в сторону дефицита, что может свидетельствовать о локальной миграции и аккумуляции лимфоидных и гранулоцитарных клеток в очаги ожогового поражения с формированием местного иммунитета.

Известно, что лимфоциты CD3⁺CD56⁺ представляют собой субпопуляцию Т-клеток со свойствами Т-лимфоцитов и естественных киллеров. Эти клетки обеспечивают цитоллиз инфицированных и повреждённых клеток организма, а также выполняют иммунорегуляторную функцию, поскольку являются практически единственными клетками

источниками цитокинов на первом этапе реакции на внедрение в организм патогенов и, в основном, γ -интерферона. Этот обязательный компонент иммунного надзора обеспечивает «цитокиновый взрыв» на антигенные стимулы, обладает цитотоксичностью против внутриклеточных микробных и вирусных патогенов и против клеток, инфицированных ими. Данная субпопуляция Т-лимфоцитов участвует так же в регуляции аутоиммунных реакций, в основном за счет иммуносупрессии [155].

Глубокий дефицит клеток Т-Лф $CD3^+CD56^+$ мы обнаружили у 50% тяжелых ожоговых больных на фоне инвазивной раневой инфекции, с преобладанием в тканевых биоптатах полирезистентной микрофлоры и (или) ассоциации различных возбудителей (грибы, Гр+ и Гр- бактерий), наличия эндогенной интоксикации с микробным или аутоиммунным компонентом.

При выполнении фенотипического анализа с помощью комбинации моноклональных антител $CD56$ и $CD16$ мы выявили в общей популяции киллерных лимфоцитов две субпопуляции - одну, имеющую высокую экспрессию $CD56$ молекул и низкую (или вообще отсутствие) молекул $CD16$ ($CD56^+CD16^-$), и другую - с низкой экспрессией $CD56$ и наличием экспрессии $CD16$ ($CD56^+CD16^+$).

Фактически, это очень важные субпопуляции, т. к. первая $CD56^+CD16^-$ составляет 5-10% от всех естественных киллеров в циркуляции и активно синтезирует цитокины, в том числе и интерфероны, обладая слабым киллингом патогенов выполняет роль регуляторных НК-клеток. Тогда как другая субпопуляция $CD56^+CD16^+$, составляющая до 90-95% в циркуляции, имеет слабую секрецию цитокинов, но обладая мощной цитотоксичностью может отнесена к эффекторным НК-клеткам [103].

У тяжелообожженных пациентов в 64% случаях выявлен дефицит естественных регуляторных киллеров ($CD56^+CD16^-$), длительно сохраняющийся в динамике более чем у половины больных. Достоверное снижение количества естественных эффекторных киллеров ($CD56^+CD16^+$) отмечено у меньшего количества - 33,3% больных, причем у 5 самых

тяжелых пациентов полностью отсутствовала популяция $CD56^+CD16^-$ Лф на фоне глубокого дефицита общих естественных киллеров - $CD56^+$ Лф и эффекторных $CD56^+CD16^+$ лимфоцитов.

Впервые при ожогах исследованы **моноциты с экспрессией $CD56^+$** .

Молекулы $CD56^+$ отвечают не только за киллерные функции в иммунном ответе, но и относятся к семейству NCAM-1 молекул с адгезионными свойствами и участвующих в миграции и локальной аккумуляции клеток. Появление в крови значимых количеств $CD56^+$ моноцитов чаще свидетельствует по данным литературы о нарушении процессов заживления раны и связаны с нарушениями целостности демаркационного вала, а также с изменением в нем сигналов активации клеток, с формированием воспалительно-деструктивного процесса в организме [130].

Количество данной популяции моноцитов в крови здоровых людей оказалось невелико (1,34-13,9 %). В то же время, у 66,6 % обследованных больных в различные сроки ожоговой болезни мы отметили достоверное повышение количества этих клеток 16,3 - 56,0 % ($M = 28,1$ %). Колебания $CD56^+$ моноцитов при ожогах, возможно, также обусловлены функциональными флуктуациями при формировании демаркационного вала ожогового струпа и активностью лейкоцитов в области первичного тканевого некроза.

Впервые при ожогах обнаружено в общем пуле **$CD40^+$ лимфоцитов** две субпопуляции-1 и 2 (рис. 7.1).

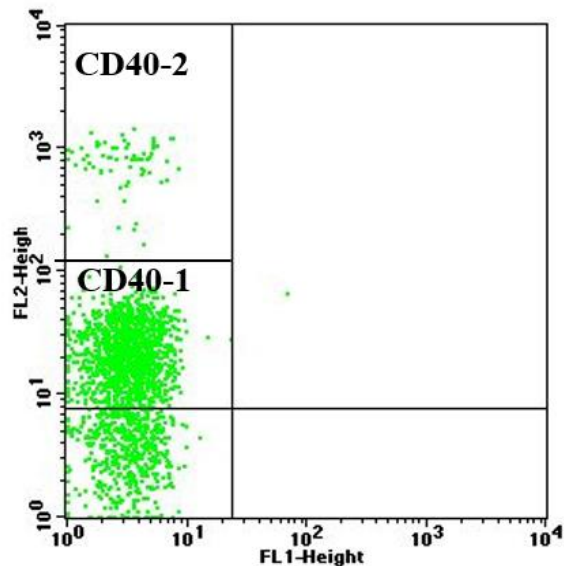


Рис.7.1. Dot Plot субпопуляции - 1 и 2 лимфоцитов с экспрессией $CD40^+$ (проточная цитометрия)

Высказано предположение о возможном присутствии В-лимфоцитов - памяти в субпопуляции - 2. Показана четкая связь между уровнем общих В-лимфоцитов и $CD40^+$ - субпопуляцией – 2. У всех пациентов (в 100% случаев), имеющих высокий уровень В-лимфоцитов, отмечено достоверное увеличение и $CD40^+$ субпопуляции – 2 (рис. 7.2).

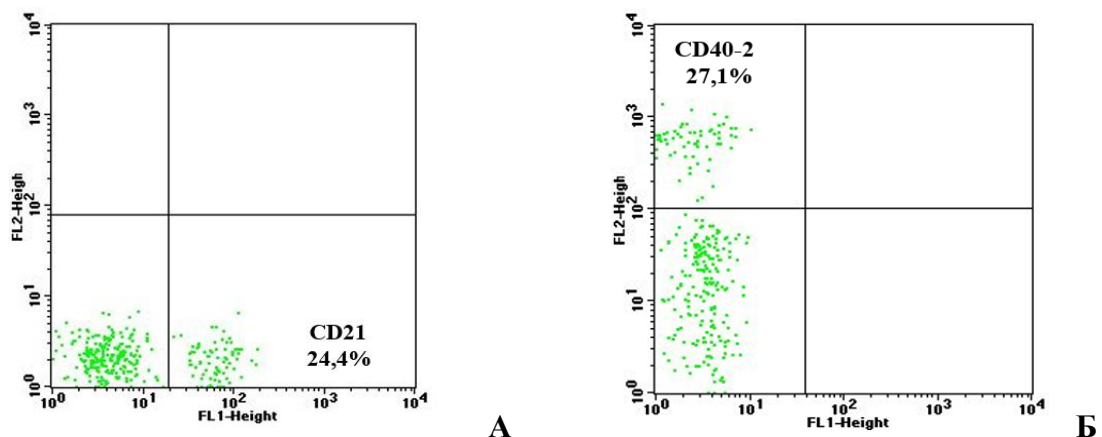


Рис. 7.2. Пример совпадающего высокого уровня В-лимфоцитов (А) и субпопуляции $CD40^+$ - 2 лимфоцитов (Б) у пациента с ожогами (Dot Plot, проточная цитометрия)

Кроме того показано, что в популяции $CD21^+CD40^+$ основную часть (около 97%) составляют именно В-лимфоциты ($CD21^+$). В ряде наблюдений,

в зависимости от состояния пациента, процент клеток, несущих этот маркер, в данной популяции значительно увеличивался, по-видимому, за счет миграции в этот пул определенных Т-клеток, несущих CD40⁺ молекулы.

Выявленный феномен представляет повышенный интерес для интерпретации иммунного статуса при ожогах, тем более что маркеру CD40 принадлежит существенная роль в контактных взаимодействиях между Т- и В-клетками. CD40 молекулы индуцируют ряд важных иммунных реакций гуморального типа: пролиферацию и дифференцировку В-клеток, синтез определенных классов иммуноглобулинов, развитие клеток памяти и др. CD40 играет важную роль в выживаемости и росте В-клеток, а передача сигнала через CD40 спасает В-клетку от индуцированного апоптоза, обеспечивает переключение синтеза различных классов иммуноглобулинов. Очень существенно, что аналогичный сигнал генерируется в макрофагах, эндотелиоцитах и фибробластах и включает активационные события, важные для осуществления воспалительной реакции и репарации [58, 87, 91, 204].

Иммунные индексы представляют собой соотношения клеток с экспрессией различных маркеров активации (CD25, HLA-DR), адгезии (CD11b) и апоптоза (CD95) и использовались нами в диагностике нарушений клеточно-молекулярных функций Т-системы иммунитета у пациентов с ожогами впервые.

По данным литературы повышение индексов CD11b/HLA-DR и снижение клеток с ранними маркерами активации - CD25/HLA-DR свидетельствует о нарушении активации иммунокомпетентных клеток крови за счет развития дефицита функциональной активности клеток, а точнее об истощении их функционального резерва, т. е. резерва иммунного ответа. Увеличение индексов активации и апоптоза свидетельствует о снижении адгезивной и активационной способности Т-лимфоцитов на фоне повышенной готовности к апоптозу, т. е. позволяет косвенно судить о развитии иммунодефицитного состояния, тогда как снижение индекса CD25/CD95 свидетельствует о преобладании апоптоза над активацией и

может даже отражать наличие острого воспаления. Повышение индексов CD11b/CD25, CD11b/HLA-DR, CD95/CD25, CD95/HLA-DR и снижение (или нормальные значения) CD11b/CD95 отражают развитие иммунного ответа по пути апоптоза, что является основой хронизации и персистенции инфекции (Титов Л. П. и др., 2007).

По нашим данным у больных с обширными ожогами отмечается тенденция изменений индексов CD11b/CD25 и CD11b/HLA-DR в сторону дефицита, а индекс CD25/HLA-DR в основном оставался в пределах физиологических колебаний. Изменение индексов на 2-е сутки после травмы в стадию ожогового шока сопровождалось достоверным возрастанием CD11b/HLA-DR и CD25/HLA-DR, а уже к 7-м суткам сохранялась тенденция изменений индексов CD11b/CD25 и CD11b/HLA-DR в сторону дефицита, в то же время индекс CD25/HLA-DR в основном оставался в пределах физиологических колебаний.

Таким образом, применение в обследовании ожоговых больных новых фенотипических маркеров Т-лимфоцитов и других клеток, ряда иммунных фенотипических индексов, отражающих соотношение различных субпопуляций Т-лимфоцитов с экспрессией соответствующих маркеров, уже сегодня способствует получению крайне важной и принципиально новой информации о состоянии иммунной системы, воспалении, бактериальных осложнениях ожоговых больных и широко используется нами для более точной диагностики инфекционных осложнений, являясь необычайно важной составляющей персонифицированного подхода в назначении иммуотропной терапии и других видов комплексного лечения ожоговой болезни [19].

Так, у 20 тяжелообожженных пациентов с применением инновационного иммунодиагностического подхода использован персонализированный алгоритм иммунокоррекции нарушений иммунного статуса. Отмечена эффективность по клинико-лабораторным и иммунологическим параметрам, причем наиболее положительный эффект

отмечен при использовании препаратов внутривенных иммуноглобулинов в более высоких разовых дозах (0,2-0,4 г/кг), рассчитанных на массу тела больного, особенно после проведения курсового лечения в виде продленных инфузий 3-5 дней подряд при условии своевременного начала иммунозаместительной терапии до развития сепсиса.

В ряде наблюдений у 7 пациентов с обширными ожогами более 50% п.т., рефрактерным течением септического процесса, комбинированной травмой и лизисом пересаженных аутодермотрансплантатов потребовались повторные курсы введения ВВИГ (от 900 - 1200 мл) с положительным клинико-иммунологическим эффектом, что демонстрирует следующий клинический случай длительного лечения тяжелообожженной пациентки.

7.1. Клинический пример

Пациентка Д., 25 лет, переведена в Ожоговый центр НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского на 3 сутки после травмы для оказания специализированной высокотехнологичной медицинской помощи с диагнозом: Комбинированная травма: Ожог пламенем лица, шеи, туловища, верхних и нижних конечностей I-II-III ст. 55% п.т. (III ст. - 42%). Термоингаляционная травма I ст. Ушибленные раны н/3 обеих голени. Частичный разрыв ахиллова сухожилия справа.

При поступлении состояние крайне тяжелое, относительно стабильное. Тяжесть состояния обусловлена тяжелой обширной ожоговой травмой, термоингаляционной травмой, требующей проведения ИВЛ, развитием ожоговой болезни. По клинико-лабораторным данным сохраняются признаки ожогового шока с переходом в стадию острой ожоговой токсемии и, в условиях сохраняющихся ишемически-реперфузионных нарушений, формируются условия для прогрессирования микробной инвазии с развитием тяжелой инвазивной раневой инфекции.

Локальный статус при поступлении (рис. 7.3): ожоговые раны расположены в области лица, шеи, туловища, верхних и нижних конечностей в виде гиперемии, пузырей, дезэпителизированных поверхностей розового, красного и местами серого цвета, с серозным отделяемым и перифокальным воспалением вокруг. Отмечается отечность мягких тканей лица, верхних и нижних конечностей.



Рис. 7.3. Вид ожоговых ран в области нижних (А) и верхних (Б) конечностей на момент поступления в ожоговый центр

В связи с тяжестью состояния лечение больной было начато в отделении реанимации-интенсивной терапии ожогового центра. С целью уменьшения интоксикации по жизненным показаниям выполнена хирургическая обработка ожоговых ран туловища, верхних и нижних конечностей 30% п.т., некрэктомия ожогового струпа в области левой верхней конечности.

По персонифицированному алгоритму выполнен комплексный анализ иммунного статуса (рис. 7.4), а также общелабораторные и инструментальные методы обследования, в том числе для решения вопроса о дальнейшей тактике хирургического лечения и иммунокоррекции на фоне проведения комплексного лечения.

Пациент Д.	25 лет	04.08.2022			
Лейкоциты	Ед. изм.	Норма мин		Пациент	Примеч.
Нейтрофилы общие (гранулоциты)	млрд/л	4,7	7,9	7,110	НОРМА
	процент	43	74,5	84,500	1 СИС
Нейтрофилы с/я	млрд/л	2,19	5,65	6,008	1 СИС
	процент	37	67	65,000	НОРМА
Нейтрофилы п/я	млрд/л	1,89	5,31	4,622	НОРМА
	процент	0	8,5	19,500	3 СИС
Миелоциты	млрд/л	0	0,67	1,386	3 СИС
	процент	0	0	0,000	НОРМА
Юные	млрд/л	0	0	0,000	НОРМА
	процент	0	0	0,000	НОРМА
Базофилы	млрд/л	0	1	0,000	НОРМА
	процент	0	0,065	0,000	НОРМА
Эозинофилы	млрд/л	0,5	5	0,000	3 СИС
	процент	0	0,3	0,000	НОРМА
Индекс сдвига крови ИС	отношение	0,06		0,300	>
Индекс сдвига крови ИСЛК	отношение	> 2,4		5,452	>
Лейкоц.индекс интоксикации ЛИИ	отношение	>1.5-интоксикация	4-5- + бакт. комп	6,710	>
Токсическая зернистость нейтрофилов		100% средняя			>
Лимфоциты	процент	14	38	10,000	1 СИС
	млрд/л	0,85	2,57	0,711	1 СИС
Моноциты	процент	3	13	5,500	НОРМА
	млрд/л	0,2	0,89	0,391	НОРМА
CD3 (Т-лимфоциты)	процент	60	80	72,000	НОРМА
	млрд/л	0,77	1,69	0,512	2 СИС
CD4 (Т-хелперы/индукторы)	процент	34,04	58	49,100	НОРМА
	млрд/л	0,46	1,08	0,349	1 СИС
CD8 (Т-цитотоксич./супрес.)	процент	22	41	18,400	1 СИС
	млрд/л	0,25	0,87	0,131	2 СИС
CD11b\CD25	усл.ед.	1,52	6,05	1,708	НОРМА
CD11b\HLA-DR	усл.ед.	1,1	6,71	0,736	2 СИС
CD25\HLA-DR	усл.ед.	0,23	2,12	0,431	НОРМА
CD4/CD8	усл.ед.	1,01	2,16	2,668	1 СИС
CD21 (зрелые В-лимфоциты)	процент	5,86	15,7	14,500	НОРМА
	млрд/л	0,05	0,4	0,103	НОРМА
CD14 (рецептор ЛПС, эндотоксинов)	процент	5,38	28,79	7,350	НОРМА
на гранулоцитах	млрд/л	0,18	1,63	0,442	НОРМА
CD14 (рецептор ЛПС, эндотоксинов)	процент	76	97	93,900	НОРМА
на моноцитах	млрд/л	0,18	0,65	0,367	НОРМА
CD16 (NK-клетки)	процент	6,47	17,8	3,400	2 СИС
	млрд/л	0,05	0,46	0,024	2 СИС
CD16 (Fc - рецепторы на гранулоцитах)	процент	91	99	90,800	НОРМА
	млрд/л	2,35	6,02	5,455	НОРМА
CD16 (Fc - рецепторы на моноцитах)	процент	5	21	52,200	3 СИС
	млрд/л	0,03	0,15	0,204	2 СИС
CD11b (Интегрин Mac-1)	процент	12,92	50,7	11,070	1 СИС
(на лимфоцитах)	млрд/л	0,22	0,99	0,079	2 СИС
CD11b (Интегрин Mac-1)	процент	97,23	100	99,900	НОРМА
(на гранулоцитах)	млрд/л	2,32	6,17	6,002	НОРМА
CD11b (Интегрин Mac-1)	процент	79,2	100	98,200	НОРМА
(на моноцитах)	млрд/л	0,35	1	0,384	НОРМА
CD25 (рецептор IL-2)	процент	2,27	18,42	6,480	НОРМА
(на лимфоцитах)	млрд/л	0,03	0,21	0,046	НОРМА
CD25 (рецептор IL-2)	процент	0	3,7	5,760	2 СИС
(на моноцитах)	млрд/л	0	0,02	0,023	1 СИС
CD64 (высокоаффинный Fc-гамма-рецептор)	процент	0,75	7,5	91,100	3 СИС
(на активированных Гранул)	млрд/л	0,03	0,3	5,473	3 СИС
CD64 (высокоаффинный Fc-гамма-рецептор)	процент	78,4	97	96,700	НОРМА
(на моноцитах)	млрд/л	0,18	0,56	0,378	НОРМА
CD3/HLA-DR (антиген ГКГС II класса)	процент	2,74	24,5	1,310	2 СИС
(на лимфоцитах)	млрд/л	0,03	0,18	0,007	3 СИС
HLA-DR (на моноцитах)	процент	60,2	95	21,300	2 СИС
	млрд/л	0,16	0,6	0,083	2 СИС
HLA-DR (на лимфоцитах)	процент	8,7	17	15,050	НОРМА
	млрд/л	0,1	0,36	0,107	НОРМА
CD45 (общий антиген Лк на Лф)	процент	90	100	96,150	НОРМА
CD45 (общий антиген Лк на Гр)	процент	100	100	99,000	НОРМА
CD45 (общий антиген Лк на Мн)	процент	100	100	91,500	1 СИС
CD3\CD56	процент	3,6	22,31	0,650	3 СИС
(НК Т-лимфоциты)	млрд/л	0,04	0,33	0,003	3 СИС
CD56 (NCAM1) (молекула межклеточной адгезии) на Лф	процент	3,07	14	1,850	2 СИС
	млрд/л	0,11	0,19	0,013	3 СИС
CD56+CD16+	процент	4,84	24	2,820	2 СИС
	млрд/л	0,004	0,38	0,020	НОРМА
CD56+CD16-	процент	6,63	15,41	0,230	3 СИС
Регуляторные НК-клетки	млрд/л	0,12	0,38	0,002	3 СИС
CD56-CD16+	процент	0,19	2,02	1,290	НОРМА
	млрд/л	0,003	0,02	0,009	НОРМА
CD56 (NCAM1) (молекула межклеточной адгезии) на Мн	процент	1,34	13,92	0,300	3 СИС
	млрд/л	0,01	0,1	0,001	3 СИС
Хемилюминисценция фаг.(люм.)	УЕ/10000 фаг.	3,19	16,38	3,43	НОРМА
Хемилюминисценция фаг.(люц.)	УЕ/10000 фаг.	12,38	22,87	5,09	2 СИС
Иммуноглобулин G	г/л	7,2	16,4	4,33	2 СИС
Иммуноглобулин A	г/л	0,9	2,5	1,14	НОРМА
Иммуноглобулин M	г/л	0,65	2,8	0,78	НОРМА

Рис. 7.4. Результаты иммунного статуса пациентки Д. при поступлении

В иммунном статусе (см. рис. 7.4) выявлен дегенеративный сдвиг формулы крови: повышение палочкоядерный нейтрофилов, индексов эндогенной интоксикации и токсического повреждения нейтрофилов без лейкоцитоза. Отмечается лимфопения с развитием абсолютного дефицита Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-Лф с иммунодепрессией (дефицит активированных CD3/HLA-DR Лф). Обращает на себя внимание практически полное подавление всей клеточной киллерной системы (рис. 7.5 (А, Б, В, Г)), о чем свидетельствует глубокий дефицит естественных киллеров - 1 и - 2 ($CD16^+$, $CD56^+$), всех регуляторных и эффекторных субпопуляций киллерных лимфоцитов ($CD56^+CD16^+$, $CD56^+CD16^-$), НК-Т-лимфоцитов ($CD3^+/CD56^+$) и моноцитов с экспрессией $CD56^+$ молекул адгезии NCAM-1.

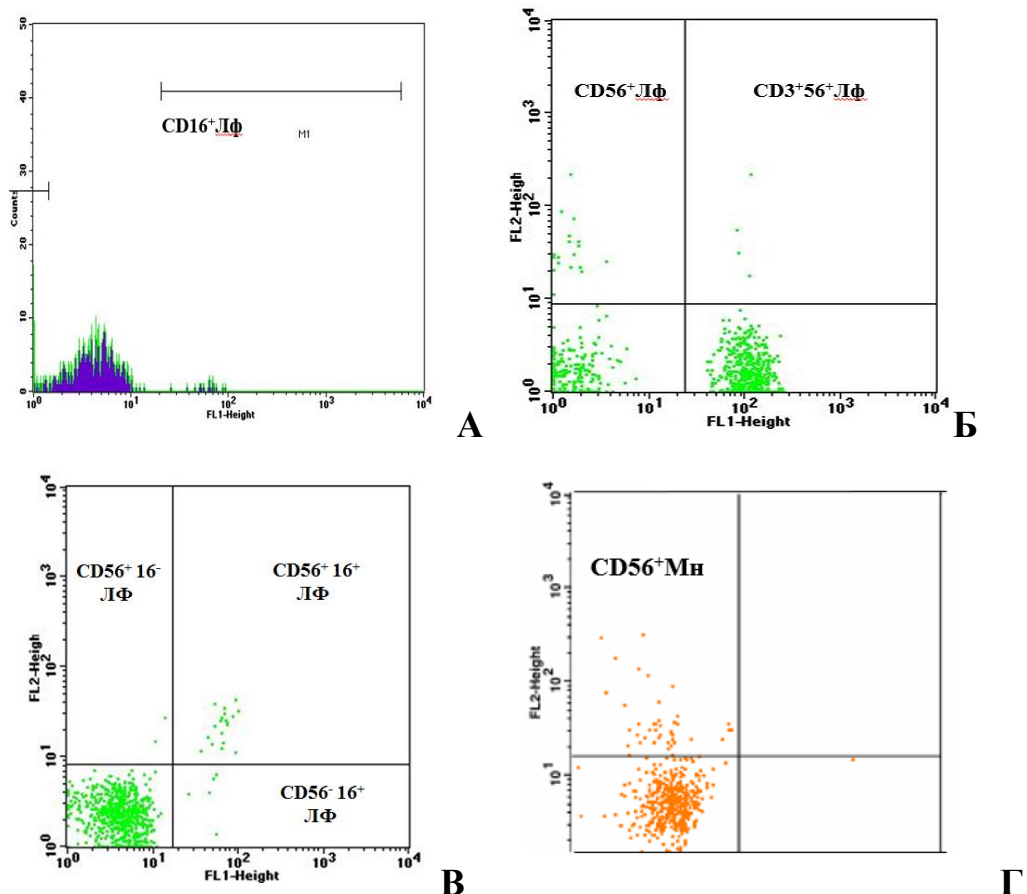


Рис. 7.5. Дефицит $CD16^+$ (А), $CD56^+$, $CD3^+/CD56^+$ (Б), $CD56^+CD16^+$, $CD56^+CD16^-$ (В), 56^+ Моноцитов (Г) у пациентки Д. (Dot Plot -проточная цитометрия)

Выявлен глубокий дефицит гуморального иммунного звена на уровне содержания ключевого иммуноглобулина IgG – 4,3 г/л (норма от 7,2 г/л).

При этом регистрируется чрезвычайно высокий уровень гранулоцитов с экспрессией высокоаффинного Fcγ-рецептора для IgG - «септический маркер» CD64⁺ до 91,1% (при норме <17,0%) (рис.7.6) при дефиците HLA-DR⁺ моноцитов - 21,3% (при норме >50%).

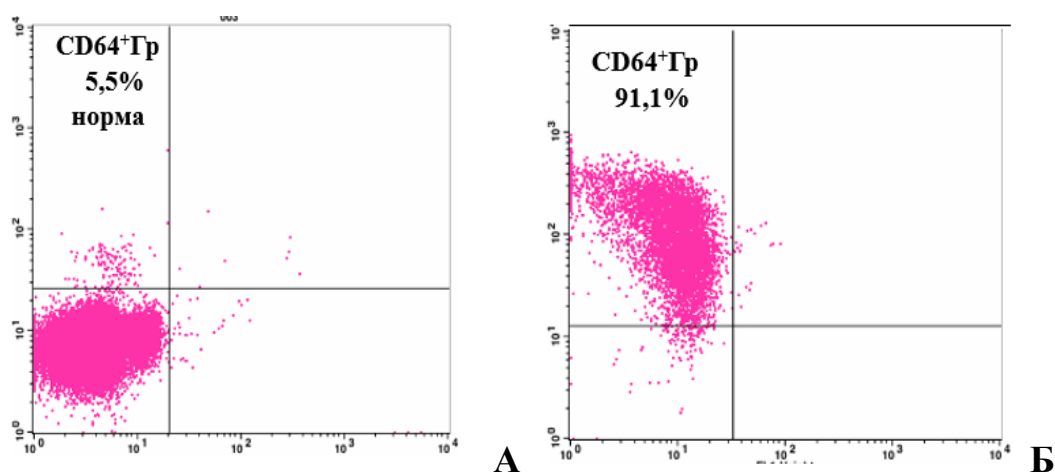


Рис.7.6. Dot Plot (проточная цитометрия) уровня CD64⁺ гранулоцитов у здорового человека (А) и пациентки Д. на 3-и сутки после травмы (Б)

Негативные изменения маркеров иммунного статуса, согласно формуле прогноза сепсиса, свидетельствовали о высоком риске развития раннего сепсиса при несостоятельности антимикробного, цитотоксического киллерного потенциала и гуморального звена иммунной системы.

Кроме того, выявлен глубокий дефицит общих гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови CD45^{dim}34⁺ в том числе жизнеспособных (Via) и функционально зрелых регенераторных субпопуляций CD45^{dim}34⁺38⁺ при полном исчезновении незрелых «резервных» ГСК CD45^{dim}34⁺38⁻ (рис. 7.7), что явилось также неблагоприятным прогностическим признаком.

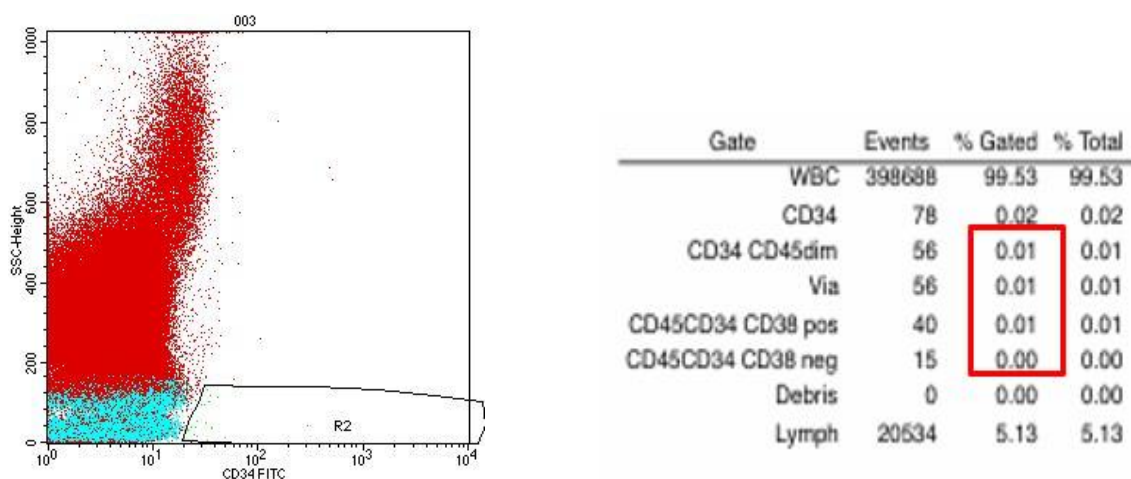


Рис. 7.7. Анализ ГСК пациентки Д. на 3-и сутки после травмы (проточная цитометрия)

Несмотря на проведение комплексной терапии, у больной течение ожоговой болезни осложнилось развитием раннего сепсиса, септического шока с возрастанием лабораторных маркеров инфекционного процесса СРБ 210,4 мг/л, ПКТ 1,24 нг/мл и прогрессированием сердечно-сосудистой, почечной недостаточности, что потребовало проведения сеансов экстракорпоральной детоксикации, в объеме продленной вено-венозной гемодиализации.

Учитывая тяжесть состояния пациентки, клинико-лабораторные данные и выявленный сочетанный иммунодефицит на фоне развития раннего сепсиса с высоким риском прогрессирования органной дисфункции при нарастании инфекционной интоксикации, рекомендовано проведение иммунозаместительной терапии препаратами в\в иммуноглобулинов после проведения сеансов гемодиализации. Применен ВВИГ (иммуновенин) в дозе по 50 мл в сутки в\в капельно, 10 дней подряд.

Дальнейшее наблюдение и лечение пациентки продолжено в отделение реанимации-интенсивной терапии в условиях противоожоговой флюидизирующей кровати, где больной проводилась комплексная интенсивная терапия ожоговой болезни, лечение и профилактика ее осложнений, включая ИВЛ, инфузионную, антибактериальную,

гастропротективную, антикоагулянтную, ингаляционную и симптоматическую терапию, энтеральное и парентеральное питания в соответствии с клиническими рекомендациями. Проводилось местное лечения ран с выполнением расширенных перевязок с раствором повидон-йода для формирования сухого ожогового струпа. На фоне проводимой комплексной терапии состояние больной стабилизировалось, пациентка на 7-е сутки экстубирована и переведена на самостоятельное дыхание. Выполнена хирургическая некрэктомия ожоговых ран верхних и нижних конечностей 12% п.т.

На фоне лечения состояние оставалось тяжелым, в целом относительно стабильным. Поверхностные и пограничные ожоги эпителизировались, в области глубоких ожогов оставался сухой струп с участками нагноения, в области некрэктомии – сформировались вялые грануляции с серозно-гнойным отделяемым, раны в области н/3 голени также выполнились грануляциями.

В дальнейшем тяжесть состояния пациентки была обусловлена ожоговой болезнью в стадии септикотоксемии на фоне обширных, глубоких ожоговых ран в области обеих верхних и нижних конечностей на площади 42% п.т., сохраняющейся интоксикацией за счет развития тяжелой инвазивной раневой инфекции, сепсиса, ассоциированными с панрезистентной нозокомиальной микрофлорой: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*. На фоне проводимого комплекса лечения удалось сдержать генерализацию тяжелого инфекционного процесса, прогрессирования полиорганной дисфункции. В связи обширными глубокими ожогами по жизненным показаниям проводились этапные операции по их пластическому закрытию. Так на 24-е сутки после травмы выполнена хирургическая обработка и аутодермопластика ожоговых ран левой голени и бедра 4% п.т. Продолжено местное лечение с использованием повязок с растворами антисептиков, ксенопластика, проводились этапные ультразвуковые

обработки гранулирующих ран с целью эффективного хирургического воздействия на течение раневого процесса. На фоне проводимой терапии пересаженные аутодермотрансплантаты прижили, что коррелировало с восстановлением до уровня здоровых лиц регенераторного потенциала по всем популяциям ГСК (рис.7.8)

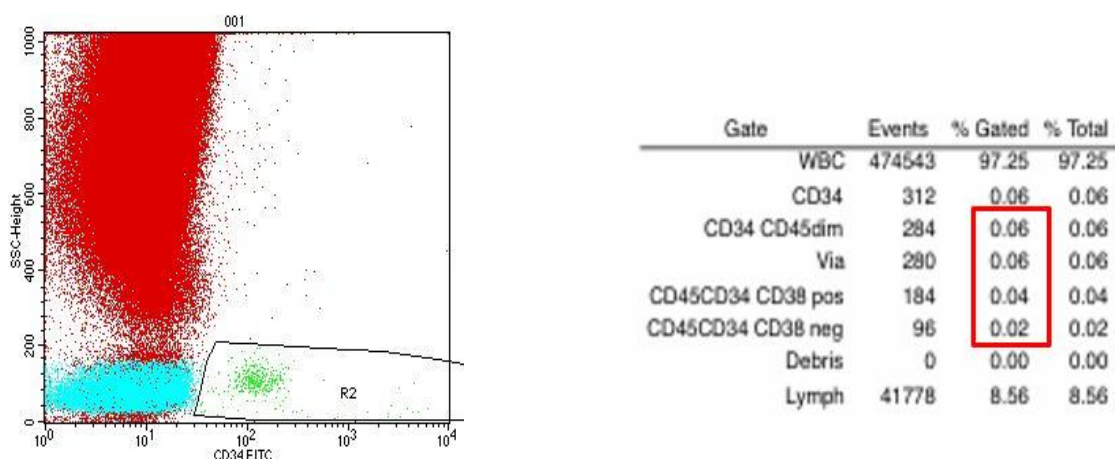


Рис. 7.8. Анализ ГСК пациентки Д. на 28-е сутки после травмы (проточная цитометрия)

На 30-е сутки удалось выполнить следующую аутодермопластику ожоговых ран правой верхней конечности 7% п.т., хирургическую некрэктомию и ксенопластику ожоговых ран правого бедра 5% п.т. В послеоперационном периоде продолжена комплексная интенсивная терапия ожоговой болезни, лечение профилактики ее осложнений.

Мониторинг иммунного статуса выявил стойкий комбинированный иммунодефицит на фоне повышения маркеров сепсиса с негативными изменениями функциональных маркеров иммунной системы, что свидетельствовало о сохранении септического процесса на фоне несостоятельности антимикробной защиты иммунной системы. Несмотря на проводимую комплексную интенсивную терапию у больной прогрессировали явления ожогового истощения, полиорганной недостаточности, отмечалась гипотермия. Пересаженные аутодермотрансплантаты в области левой верхней конечности и бедер прижили на части площади. Наблюдался лизис

пересаженных аутодермотрансплантатов в области левой голени и левой верхней конечности до 5% п.т. с формированием множества фокусов гнойного расплавления в подкожно-жировой клетчатке и участков третичного некроза на остальной площади глубоких ожогов в области обеих стоп, голеней и бедер. Принято решение о проведении повторного курса заместительной иммунотерапии ВВИГ (иммуновенин) по 50 мл в сутки в\в капельно, 10 дней подряд. На фоне продолжения комплексной терапии ожоговой болезни, местного лечения, в том числе с использованием УЗ-обработок, гранулирующих ран верхних и нижних конечностей отмечена положительная динамика, что позволило подготовить раны к последующим этапным аутодермопластикам. Выполнено на протяжении последующих 1,5 месяцев лечения еще 4 этапных операции по пластическому закрытию гранулирующих ран на общей площади 35% п.т. с приживлением пересаженных аутодермотрансплантатов (рис. 7.9).



Рис. 7.9. Вид после хирургической обработки и аутодермопластики гранулирующих ран нижних конечностей

Проявления сепсиса и раневой инфекции регрессировали, при микробиологическом исследовании выявлена *Klebsiella pneumoniae* только в тканевых биоптатах в низком титре 10^2 КОЕ, ранее выделяемые м/о *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* - не обнаружены. Вследствие проводимого комплексного лечения состояние пациентки стабилизировалось, в дальнейшей интенсивной терапии

не нуждалась и переведена из реанимации в ожоговое отделение на 84-е сутки лечения.

При динамическом исследовании иммунного статуса, с одной стороны, отмечалось определенное улучшение состояния иммунной системы, что подтверждается нормализацией 11 ранее резко измененных маркеров и что очень существенно - нормализацией лейкоцитоза, устранением сильнейшей эндогенной интоксикации по индексам сдвига крови и купированием дефицита клеточного киллерного звена. Содержание в периферической крови всех популяций ГСК также сохраняется на достаточном уровне без отрицательной динамики. В то же время, появились юные формы нейтрофилов с сохранением их токсического повреждения и резкого возрастания содержания Гр с экспрессией «септического» маркера CD64⁺ до 98,0 % (рис. 7.10).



Рис. 7.10. Динамика уровня «септического» маркера CD64⁺

Одновременно отмечено утяжеление дефицита гуморального иммунного звена на уровне всех трех классов иммуноглобулинов IgG 4,32 г/л (норма 7,2-16,4 г/л), IgM 0,4 г/л (норма 0,65-2,8 г/л), IgA 0,72 г/л (норма 0,9-

2,5 г/л). Учитывая все изменения иммунного статуса, сохраняется высокий риск быстрого развития генерализации инфекции.

Клинически у больной нарастают признаки системной воспалительной реакции с признаками дыхательной, почечной и сердечно-сосудистой недостаточности (SOFA 4 балла). При посевах крови на стерильность получен рост грибковых штаммов *Candida albicans*. На Rg-ОГК: диффузное снижение прозрачности легочных полей (может соответствовать интерстициальному отеку легких/ инфильтративным изменениям). При дообследовании КТ ОГК: множественные пневмонические инфильтраты в обоих легких, что соответствует развитию поздней нозокомиальной, двухсторонней полисегментарной пневмонии (6 баллов по CPIS). Также у пациентки имеет место развитие нозокомиальной диареи, скорее всего вызванной кишечным дисбиозом и связанной с прогрессированием энтеропатии. Диагностирован рецидив сепсиса, причиной которого явилась проблемная нозокомиальная раневая инфекция, инвазивный кандидоз, кандидемия на фоне формирующего ожогового истощения и сохраняющегося иммунодефицита.

Принимая во внимание тяжесть состояния пациентки, наличие ран верхних и нижних конечностей 11% п.т., представленных бледно-розовыми грануляциями с умеренным гнойным отделяемым, высокий риск прогрессирования полиорганной дисфункции вторичной к инфекции на фоне выраженного интоксикационного синдрома, фебрильной лихорадки до 38,3°C и не купируемый иммунодефицит гуморального иммунного звена, несмотря на проведение повторных курсов иммунозаместительной терапии, рекомендовано усилить иммунокоррекцию ВВИГ – Габриглобин в более высоких дозах по 300 мл в сутки в/в, 3 дня подряд (суммарно 900 мл) в виде продленной инфузии. Комплексная терапия дополнена целенаправленной системной противогрибковой терапией (микофунгин). В связи с тяжестью состояния комплексная интенсивная терапия и клинико-лабораторный мониторинг повторно продолжены в условиях реанимационного отделения.

Продолжена респираторная терапия, направленная на лечение инфекционных осложнений лёгочной паренхимы. С целью прямого воздействия на первичный инфекционный очаг и его санацию выполнялись перевязки с ревизией и санацией раневой поверхности, подготовкой остаточных ран к пластическому закрытию.

На фоне продолжающейся комплексной терапии состояние больной стабилизировалось. В сравнении с предыдущими результатами иммунного статуса отмечается существенная положительная динамика по количественным и функциональным маркерам, с признаками регресса инфекционно-воспалительного процесса с достоверным снижением уровня "септического" маркера CD64⁺Gr с 98,0 % до 63,0 % (см. рис) и впервые пациентке за продолжительное время лечения на 98-е сутки после травмы удалось восстановить уровень ключевого иммуноглобулина IgG до физиологической нормы (рис. 7.11) при одновременной нормализации иммуноглобулинов IgM и IgA.

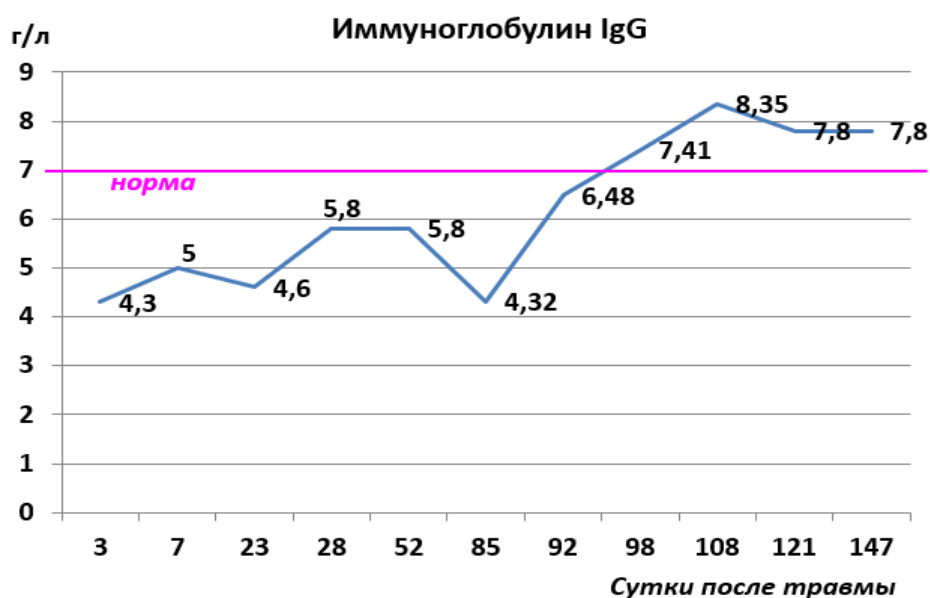


Рис. 7.11. Динамика уровня иммуноглобулина IgG

В дальнейшем успешно проведены 3 этапных операции - хирургическая обработка и аутодермопластика гранулирующих ран левой верхней и нижних конечностей 4% п.т., правой ягодицы, нижних

конечностей 3% п.т., верхних и нижних конечностей 3% п.т. Пересаженные аутодермотрансплантаты прижили. В Ожоговом отделении на фоне стабильного состояния пациентки продолжена комплексная терапия ожоговой болезни и ее осложнений, местное лечение остаточных ран. Начата активизация больной, курсы гидротерапии ран, перевязки с применением раневых покрытий. На фоне лечения общее состояние с положительной динамикой, прекратились лихорадка и явления интоксикационного синдрома, энтеропатии, в области проведенных ранее аутодермопластик отмечена активная краевая и островковая эпителизация остаточных ран. В динамике получены отрицательные посевы крови и тканевых биоптатов.

Пациентка стала активнее, самостоятельно стала вставать с кровати, ходить с небольшой поддержкой. В связи с завершением лечения по поводу ожогов пациентка в удовлетворительном состоянии выписана, локальный статус: пересаженные аутодермотрансплантаты прижили, эпителизировались, единичные остаточные ранки в области туловища, нижних конечностей с активной эпителизацией (Рис. 7.12).



Рис. 7.12. Вид ран пациентки Д. после завершения операций по пластическому закрытию кожного покрова

Результаты иммунологических исследований					
Пациент Д.	26 лет	30.11.2022			
	Ед. изм.	Норма мин		Пациент	Примеч.
Лейкоциты	млрд/л	4,7	7,9	8,600	1 СИС
Нейтрофилы общие (гранулоциты)	процент	43	74,5	77,500	1 СИС
	млрд/л	2,19	5,65	6,665	1 СИС
Нейтрофилы с/я	процент	37	67	68,000	1 СИС
	млрд/л	1,89	5,31	5,848	1 СИС
Нейтрофилы п/я	процент	0	8,5	4,000	НОРМА
	млрд/л	0	0,67	0,344	НОРМА
Миелоциты	процент	0	0	0,000	НОРМА
	млрд/л	0	0	0,000	НОРМА
Юные	процент	0	0	0,000	НОРМА
	млрд/л	0	0	0,000	НОРМА
Базофилы	процент	0	1	1,000	НОРМА
	млрд/л	0	0,065	0,037	НОРМА
Эозинофилы	процент	0,5	5	4,500	НОРМА
	млрд/л	0	0,3	0,000	НОРМА
Индекс сдвига крови ИС	отношение	0,06		0,059	НОРМА
Индекс сдвига крови ИСЛК	отношение	> 2,4		3,444	>
Лейкоц.индекс интоксикации ЛИИ	отношение	>1,5-интоксикация	>4-5- бакт. комп	0,614	НОРМА
Токсическая зернистость нейтрофилов		50% мелкая средняя			>
Лимфоциты	процент	14	38	15,500	НОРМА
	млрд/л	0,85	2,57	1,333	НОРМА
Моноциты	процент	3	13	7,000	НОРМА
	млрд/л	0,2	0,89	0,602	НОРМА
CD3 (Т-лимфоциты)	процент	60	80	83,600	1 СИС
	млрд/л	0,77	1,69	1,114	НОРМА
CD4 (Т-хелперы/индукторы)	процент	34,04	58	43,300	НОРМА
	млрд/л	0,46	1,08	0,577	НОРМА
CD8 (Т-цитотоксич./супрес.)	процент	22	41	35,500	НОРМА
	млрд/л	0,25	0,87	0,473	НОРМА
CD11b\CD25	усл.ед.	1,52	6,05	2,259	НОРМА
CD11b\HLA-DR	усл.ед.	1,1	6,71	7,176	1 СИС
CD25\HLA-DR	усл.ед.	0,23	2,12	3,176	2 СИС
CD4/CD8	усл.ед.	1,01	2,16	1,220	НОРМА
CD21 (зрелые В-лимфоциты)	процент	5,86	15,7	5,610	1 СИН
	млрд/л	0,05	0,4	0,075	НОРМА
CD14 (рецептор ЛПС, эндотоксинов)	процент	76	97	94,300	НОРМА
на моноцитах	млрд/л	0,18	0,65	0,568	НОРМА
CD16 (NK-клетки)	процент	6,47	17,8	4,500	1 СИН
	млрд/л	0,05	0,46	0,060	НОРМА
CD16 (Fc - рецепторы на гранулоцитах)	процент	91	99	99,450	1 СИС
	млрд/л	2,35	6,02	6,628	1 СИС
CD16 (Fc - рецепторы на моноцитах)	процент	5	21	10,420	НОРМА
	млрд/л	0,03	0,15	0,063	НОРМА
CD11b (Интегрин Mac-1)	процент	12,92	50,7	23,610	НОРМА
(на лимфоцитах)	млрд/л	0,22	0,99	0,315	НОРМА
CD11b (Интегрин Mac-1)	процент	97,23	100	99,940	НОРМА
(на гранулоцитах)	млрд/л	2,32	6,17	6,661	1 СИС
CD11b (Интегрин Mac-1)	процент	79,2	100	99,100	НОРМА
(на моноцитах)	млрд/л	0,35	1	0,597	НОРМА
CD25 (рецептор IL-2)	процент	2,27	18,42	10,450	НОРМА
(на лимфоцитах)	млрд/л	0,03	0,21	0,139	НОРМА
CD25 (рецептор IL-2)	процент	0	3,7	0,720	НОРМА
(на моноцитах)	млрд/л	0	0,02	0,004	НОРМА
CD64 (высокоаффинный Fc-гамма-рецептор) (на активированных Гранул)	процент	0,75	7,5	30,150	3 СИС
	млрд/л	0,03	0,3	2,009	3 СИС
CD64 (высокоаффинный Fc-гамма-рецептор) (на моноцитах)	процент	78,4	97	98,800	1 СИС
	млрд/л	0,18	0,56	0,595	1 СИС
CD3/HLA-DR (антиген ГКГС II класса)	процент	2,74	24,5	9,820	НОРМА
(на лимфоцитах)	млрд/л	0,03	0,18	0,109	НОРМА
HLA-DR (на моноцитах)	процент	60,2	95	71,550	НОРМА
	млрд/л	0,16	0,6	0,431	НОРМА
HLA-DR (на лимфоцитах)	процент	8,7	17	3,290	2 СИН
	млрд/л	0,1	0,36	0,044	2 СИН
CD45 (общий антиген Лк на Лф)	процент	90	100	99,340	НОРМА
CD45 (общий антиген Лк на Гр)	процент	100	100	94,000	1 СИН
CD45 (общий антиген Лк на Мн)	процент	100	100	99,420	НОРМА
CD3\CD56	процент	3,6	22,31	3,000	1 СИН
(НК Т-лимфоциты)	млрд/л	0,04	0,33	0,033	1 СИН
CD56 (NCAM1) (молекула межклеточной адгезии) на Лф	процент	3,07	14	4,020	НОРМА
	млрд/л	0,11	0,19	0,054	2 СИН
CD56+CD16+	процент	4,84	24	1,530	3 СИН
	млрд/л	0,004	0,38	0,020	НОРМА
CD56+CD16-	процент	6,63	15,41	7,340	НОРМА
Регуляторные НК-клетки	млрд/л	0,12	0,38	0,098	1 СИН
CD56-CD16+	процент	0,19	2,02	3,050	2 СИС
	млрд/л	0,003	0,02	0,041	3 СИС
CD56 (NCAM1) (молекула межклеточной адгезии) на Мн	процент	1,34	13,92	3,300	НОРМА
	млрд/л	0,01	0,1	0,020	НОРМА
Хемилюминисценция фаг.(люм.)	УЕ/10000 фаг.	3,19	16,38		
Хемилюминисценция фаг.(люц.)	УЕ/10000 фаг.	12,38	22,87		
Иммуноглобулин G	г/л	7,2	16,4	7,8	НОРМА
Иммуноглобулин A	г/л	0,9	2,5	2,5	НОРМА
Иммуноглобулин M	г/л	0,65	2,8	2	НОРМА

Рис. 7.13. Результаты иммунного статуса пациентки Д. на 121-е сутки после травмы

В динамике продолжается существенное улучшение иммунного статуса (рис. 7.13), на 121-е сутки после травмы отмечается нормализация лейкоцитоза, сдвига формулы крови, ЛИИ и положительная динамика снижения "септического" маркера CD64⁺ Гр с 66,9 % до 30,15 %, отмечается постепенное восстановление клеточной киллерной системы при сохранении нормального уровня общих иммуноглобулинов. Снижение HLA-DR+Лф при возрастании индекса CD25\HLA-DR может соответствовать периоду реконвалесценции ожоговой болезни без нарушения иммунорегуляции. Позитивные изменения могут свидетельствовать о снижении инфекционно-воспалительного процесса и эндогенной интоксикации в организме с восстановлением иммунного статуса на фоне локального невыраженного воспалительного процесса в остаточных очагах ожогового повреждения.

Таким образом, способность ВВИГ не только возмещать дефицитные факторы гуморального иммунного ответа, но и оказывать иммуномодулирующий эффект, купировать развитие системного воспаления и другие изменения гомеостаза, позволяет рассматривать препараты внутривенных иммуноглобулинов в качестве эффективного лекарственного средства этиопатогенетической направленности при тяжелой ожоговой травме и септических осложнениях ожоговой болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тяжелая ожоговая травма вызывает существенные нарушения иммунного статуса, сопровождающиеся воспалительной реакцией и иммунной недостаточностью разной степени выраженности, что значительно повышает восприимчивость пациентов к инфекциям и развитию гнойно-септических осложнений ожоговой болезни. Сепсис у ожоговых больных является наиболее частым и грозным инфекционным осложнением, нередко вызывающим гибель пациентов [155].

После термического повреждения тканей в крови и тканях организма появляются токсины и бактериальные антигены эндогенной и экзогенной природы. Стресс, болевая афферентная импульсация, а затем и токсины из поврежденных тканей оказывают влияние на иммунную систему организма, что меняет характер межклеточных взаимодействий с цитокинами, медиаторами нервной и эндокринной систем. В такой ситуации нарушено формирование полноценного адаптивного иммунного ответа на антигены, что вызывает подавление его клеточного и гуморального звеньев. По этой причине понятна высокая значимость своевременного и точного диагноза развития ожоговых осложнений, поскольку развитие инфекции происходит практически стремительно и промедление лечебных воздействий может оказаться фатальным для обожженного больного.

На сегодняшний день нет единой регламентированной клинической классификации сепсиса для практического применения и не существует четких диагностических критериев или формул, которые могли бы надежно прогнозировать риск генерализации инфекции и развитие сепсиса у тяжелообожженных.

Системная воспалительная реакция, вызванная ожогами, может имитировать проявление сепсиса у тяжелообожженных и усложнять его диагностику. Поиск точных и прогностически надежных маркеров генерализации инфекции интенсивно продолжается. В первую очередь он

связан с совершенствованием ранней диагностики и должен базироваться на адекватном представлении об этиологии и патогенезе заболевания.

Наши исследования согласуются с многими другими, что иммунные нарушения, лежащие в основе патогенеза ожоговой болезни, происходят чрезвычайно быстро и характеризуются дисбалансом на фоне развития вторичного ожогового иммунодефицита систем адаптивного специфического иммунного ответа и гиперактивации врожденных систем неспецифического иммунитета организма. В то же время, иммунная система является быстрым индикатором, способным практически через несколько часов охарактеризовать степень тяжести ожоговой болезни и прогноз её осложнений.

На современном этапе с внедрением в клиническую практику высокоточных методов исследования иммунного статуса, прежде всего проточной цитометрии, в работе изучены не только количественные параметры иммунного статуса, но и всесторонне исследованы функциональные особенности взаимодействия иммунокомпетентных клеток, процессы репарации тканей на клеточном и субклеточном уровне. Практическое применение широких возможностей современной иммунодиагностики становится актуальной задачей и в своевременном выявлении пациентов с риском развития инфекционно-септических осложнений, иммунодефицитных состояний и нарушений регенераторного потенциала для эффективного обеспечения комплексной терапии пациентов с обширными ожогами, включая хирургическое лечение по восстановлению кожного покрова в оптимальные сроки и системную иммуннокоррекцию поврежденных ключевых иммунных мишеней при ожогах с позиций персонализированного подхода.

Данное направление в течении нескольких лет успешно развивается в «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» и в ходе научно-исследовательской и клинико-диагностической работы были сформированы цели и задачи настоящего диссертационного исследования.

Диссертационная работа представляет собой одноцентровое ретроспективное не рандомизированное исследование и включает поэтапный анализ и обобщение более 33975 результатов клинико-иммунологических исследований 275 взрослых пациентов с обширными ожогами, госпитализированных в Ожоговый Центр ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России для оказания специализированной высокотехнологичной медицинской помощи. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров для определения референсных показателей иммунного статуса и последующего их сравнительного анализа с данными пациентов.

Всем пациентам проводилось комплексное поликомпонентное лечение по профилю «хирургия» (комбустиология). Хирургическое этапное лечение включало хирургическую некрэктомию, местное медикаментозное лечение ожоговых ран с использованием современных раневых покрытий, мазей на водорастворимой основе и аутодермопластику для восстановления кожного покрова. В работе использован широкий диапазон лабораторных методов исследования: иммунологические (проточная цитометрия, турбидиметрия, хемилюминесценция) с определением в периферической крови фенотипических мембранных маркёров на трех типах клеток, иммунных индексов, кислородного метаболизм фагоцитарных клеток, уровня сывороточных иммуноглобулинов и циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток; общие биохимические и гематологические анализы, а также клиническое обследование больных, в том числе тесты объективной оценки состояния пациента.

Проведены исследования иммунного статуса в зависимости от тяжести ожоговой травмы и стадии ожоговой болезни. Результаты настоящей работы показывают, что в период острой ожоговой токсемии у обожженных происходят глубокие изменения многих иммунных параметров, которые сохраняются и через 10-14 дней после ожоговой травмы. При этом при площади ожогового поражения >30% п.т. развиваются два альтернативных процесса – гиперактивация иммунной системы (лейкоцитоз со сдвигом

формулы крови влево, резкое возрастание гранулоцитов с экспрессией рецептора ЛПС и высокоаффинного Fcγ-рецептора (CD64+), усиление их кислородного метаболизма, функциональная активация моноцитов) и её глубокий дефицит (естественные киллеры, лимфоциты, цитотоксические CD8+Т-лимфоциты, Т-хелперы и общие Т-лимфоциты, В-лимфоциты). При обширных ожогах площадью более 30-40% п.т. усугубляется иммунодефицит преимущественно ключевого иммуноглобулина IgG, общих лимфоцитов и естественных киллеров, HLA-DR+ моноцитов при резком нарастании содержания CD64+ гранулоцитов и индексов эндогенной интоксикации.

Изменения иммунной системы у пострадавших в результате массовой катастрофы носили более глубокий негативный характер, чем в группе больных, получивших бытовую травму. Так, уровень IgG у пострадавших в массовой катастрофе регистрировался на очень низком уровне 0,9-3,0 г/л (норма 7,2-16,4 г/л), а при обширных ожогах с общей площадью от 50 до 80% п. т. у ряда больных иммуноглобулин IgG вообще исчез из циркуляции, что никогда не приходилось наблюдать в предыдущих исследованиях.

В исследовании Н. Moins-Teisserenc et al. с целью выявления закономерностей иммунного ответа при ожоговой травме с возникновением вторичных инфекций, септического шока и исходом у 50 взрослых пациентов с общей площадью ожогового поражения, в среднем 38,0% поверхности тела, использовался многофакторный анализ 69 иммунных биомаркеров. Причем маркеры были сгруппированы по 4 кластерам: врожденного и адаптивного системного иммунитета, маркеры активации и провоспалительных реакций. У пациентов с тяжелыми ожогами наблюдались статистически значимые различия в биомаркерах адаптивного и врожденного иммунитета в сравнении со здоровыми лицами. Выявлено увеличение абсолютного количества активированных Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов (CD25⁺CD4⁺, HLA-DR⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺, HLA-DR⁺CD8⁺), и снижение абсолютного количества клеток врожденного иммунитета (γδ-Т-клетки, iNKT, Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой CD3⁺CD4-γδ-CD161 hi Va7.2⁺)

[155], которые быстро реагируют на стресс, собственные и чужеродные антигены, играют важную роль в качестве первой линии защиты и гомеостаза во многих тканях, и их исчезновение из крови может быть связано с локальной аккумуляцией в поврежденных тканях [205]. У пациентов в течение первых часов после ожоговой травмы наблюдалось резкое снижение молекул HLA-DR+ на моноцитах при увеличении абсолютного количества циркулирующих нейтрофилов и моноцитов [155], участвующих при острых воспалительных процессах и стресс-реакциях [215, 222]. Нейтрофилы экспрессировали меньшее количество рецептора FcγRIII (CD16⁺), связанного с антителоассоциированной цитотоксической гибелью клеток. Ранее сообщалось, что рецепторы IgG (FcγRs) являются важными триггерами многочисленных клеточных эффекторных функций и обеспечивают связь между врожденными и адаптивными иммунными реакциями. Они обеспечивают фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность, секрецию цитокинов или других медиаторов воспаления. Среди них CD16⁺ (FcγRIIIB) и CD64⁺ (FcγRI) изменяются при развитии сепсиса [97, 112, 163].

Аналогичным образом, была резко снижена на NK-клетках экспрессия рецептора NKG2D [155], позволяющего элиминировать поврежденные клетки посредством связывания со стресс-молекулами MICA [41, 207]. Кроме того, уровни провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-17, а также противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке крови были резко повышены в течение первых часов после ожоговой травмы [155]. Преимущественно провоспалительные реакции, могут быть связаны с высвобождением молекулярных структур, ассоциированных с повреждением клеток (DAMPs) [94].

Пациенты, у которых при поступлении выявлялся дефицит субпопуляций цитотоксических лимфоцитов CD8⁺ (общих, активированных и эффекторных), В-лимфоцитов, γδ Т-лимфоцитов и клеток iNKT были более склонны к бактериальным инфекциям. Причем, значительное снижение количества HLA-DR+ моноцитов на 7-е сутки и их замедленное

восстановление на фоне поздней дисрегуляции выработки цитокинов были связаны с возникновением септического шока [70, 155]. Моноцитарный HLA-DR+ антиген один из наиболее изученных биомаркеров при сепсисе и низкая его экспрессия идентифицирует пациентов с высоким риском септического шока при критических состояниях [206, 146, 156]. В то же время, ни один кластер иммунных и провоспалительных биомаркеров на ранних этапах ожоговой болезни не был связан со смертностью. Однако, отсутствие восстановления иммунного статуса в динамике было связано с неблагоприятным прогнозом [155].

Результаты нашего исследования также показали важное значение мониторинга иммунного статуса на разных этапах комплексного лечения тяжелообожженных пациентов для своевременного выявления иммунных нарушений и диагностики гнойно-септических осложнений. Данный подход позволил из очень широкого диапазона конститутивных, активационных, функциональных маркеров (более 45 параметров) иммунного статуса отобрать наиболее информативные показатели и адаптировать иммунную панель для получения объективной информации о нарушениях в различных звеньях иммунной системы при ожогах.

Важность ранней диагностики сепсиса и своевременного начала лечения невозможно переоценить. Ранняя диагностика сепсиса имеет первостепенное значение для выбора эффективной тактики ведения пациентов с ожогами, поскольку она оказывает заметное влияние на результаты лечения и выживаемость. Наилучшим вариантом для раннего выявления пациентов с сепсисом является сочетание, как клинической оценки состояния больного, так и значений панели иммунных биомаркеров.

Решением данной задачи послужила разработка иммунной количественной формулы диагностики сепсиса. При иммунологическом обследовании 85 ожоговых больных, из которых 45 больных составили основную группу с сепсисом, 40 пациентов составили группу сравнения без развития сепсиса. В 84,4% случаях основной группы против 52,5% пациентов

группы сравнения общая площадь ожогов составила >30% п.т. Иммунологически обследовали также группу из 30 здоровых доноров (контрольная группа).

Установлено, что при тяжелом ожоговом поражении уже через 1-2 суток развивается глубокий дефицит общих лимфоцитов. При относительном уровне Лимфоцитов <9,3% ($\chi^2 = 18,44$, $P < 0,001$) количество пациентов основной группы с сепсисом составило в 3,3 раза больше, чем в группе сравнения без сепсиса (66,7% против 20% больных), что позволяет определить этот показатель как один из составляющих критериев диагностического алгоритма прогноза развития сепсиса. Диагноз сепсиса оказывается возможным при относительном содержании НК-клеток <5% ($\chi^2=26,65$, $P < 0,001$), поскольку разница дефицитного уровня естественных киллеров у больных основной группы и группы сравнения составила в 4,7 раза (71,1% против 15% больных). Вместе с тем, количество ожоговых больных с сепсисом с содержанием иммуноглобулина IgG <6 г\л оказалось в 7,4 раза больше в сравнении с группой больных без сепсиса – 55,6% и 7,5% соответственно. Таким образом, уровень иммуноглобулина IgG <6 г\л ($\chi^2= 20,39$, $P < 0,001$) является информативным в диагностике сепсиса у ожоговых больных. Для прогноза сепсиса значение ЛИИ >4 ЕД оказывается достоверно значимым ($\chi^2= 14,86$, $P < 0,001$). Указанный уровень регистрировался у 55,6% пациентов с ожоговым сепсисом – это в 3,7 раза больше, чем при ожогах без развития сепсиса - в 15% наблюдений. Снижение уровня HLA-DR+ моноцитов <50% высокоинформативно в диагностике сепсиса, поскольку данный маркер снижается у большего числа пациентов в 2,1 раза при развитии сепсиса 53,3% против 25% без него ($\chi^2= 7,0$, $P < 0,01$). Выраженность палочкоядерного сдвига может быть использована в диагностике сепсиса у ожоговых пациентов, т.к. при уровне П\Я нейтрофилов >21% ($\chi^2 = 26,91$, $P < 0,001$) число больных в группе с сепсисом резко возрастает до 75,6% против 25% случаев в группе без сепсиса и оказывается достоверным (разница в 3,02 раза). Маркер CD64+ гранулоцитов

является ключевым в диагностике при ожогах как «септический» маркер при очень высоких относительных числах 90-100% (при норме <15 %).

Таким образом, на основе комплекса проведенных иммунодиагностических исследований впервые разработана числовая формула ранней диагностики сепсиса при ожоговой болезни:

Лимфоциты <9,3 %

NK – клетки <5 %

HLA-DR+ моноциты <50%

Иммуноглобулин IgG <6 г\л

Палочко-ядерные нейтрофилы >21%

Индекс эндогенной интоксикации ЛИИ > 4 ЕД

CD64+ гранулоциты 90 - 100 %

Иммунная формула, включающая панель иммунных маркеров с конкретными числовыми значениями обладает высокой специфичностью (до 95%) в диагностике сепсиса и позволяет предварительно прогнозировать развитие септических осложнений до установления клинического диагноза: у 33,33% больных за 1-2 суток, у 41,7% за 3-4 суток, у 16,7% за 4-6 суток.

Новые иммунодиагностические подходы на основе комплексного анализа иммунного статуса, включая исследование субпопуляций гемопоэтических стволовых клеток и различных фенотипов иммунных клеток у тяжелообожженных, являются высокоинформативными так же и для оценки эффективности хирургического лечения, регенераторного потенциала ожоговых ран и использования иммунозаместительной терапии с позиций персонализированной медицины.

Так сравнительный анализ результатов иммунного статуса в динамике: при поступлении, на 10-е и 30-е сутки у 55 тяжелообожженных больных в возрасте $44,2 \pm 1,9$ года с общей площадью ожогового поражения $51,0 \pm 2,0$ % поверхности тела, из них глубокие ожоги в среднем достигали $19,1 \pm 2,1$ %., показал достоверные отличия по 15 ключевым иммунным маркерам в процессе комплексного лечения.

При поступлении в клинику в среднем на $13,18 \pm 2,45$ сутки после травмы выявлены существенные нарушения иммунного статуса, свидетельствующие о развитии системного воспалительного ответа и эндогенной интоксикации организма с преимущественным дефицитом содержания иммуноглобулинов на фоне дисбаланса антимикробного потенциала на уровне фагоцитарного, киллерного и Т-клеточного иммунных звеньев.

В процессе поликомпонентного интенсивного лечения ожоговой болезни, направленного на протекцию органных дисфункций и элиминацию микробных антигенов и токсинов, профилактики осложнений, включающей хирургическое лечение с выполнением этапных некрэктомий и аутодермопластик гранулирующих ран и методы местного лечения с использованием ксенотрансплантов и повязок с растворами антисептиков к $40,8 \pm 2,9$ суткам после ожоговой травмы в исследуемой группе пациентов удалось успешно восстановить кожные покровы на площади $10,6 \pm 1,1$ % п.т. с полным приживлением пересаженных аутодермотрансплантатов и активной эпителизацией в ячейках. При этом выявлены достоверно значимые позитивные изменения следующих ключевых маркеров иммунного статуса - лимфоциты общие ($p=0,0001$), лимфоциты с экспрессией активационных молекул CD25+ ($p=0,008$) и HLA-DR+ ($p=0,0002$), иммунорегуляторный индекс CD4+/CD8+ ($p=0,02$), В-лимфоциты CD21+ ($p=0,002$), IgG ($p < 0,0001$). Отмечена нормализация показателей врожденного иммунитета, в том числе гранулоцитов с экспрессией CD64+ и моноцитов с экспрессией HLA-DR+ антигена. Позитивные изменения иммунного статуса с купированием эндогенной интоксикации и нормализацией антимикробного потенциала в целом позволили эффективно продолжить хирургическое лечение по восстановлению кожного покрова на фоне комплексной терапии тяжелообожженных.

Необходимо отметить, что нормализация иммунного статуса, отмеченная у больных, которым удалось своевременно удалить

нежизнеспособные ткани на большей площади поражения и начать восстановление кожного покрова с пластическим закрытием ожоговых ран в более ранние сроки, позволила предотвратить развитие септических осложнений у 43 (78,2%) пациентов.

Разработка новых методов анализа циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток, а также их жизнеспособных ранних и зрелых субпопуляций в процессе комплексного лечения больных с тяжелыми ожогами с применением хирургических технологий позволяет получить дополнительную объективную информацию о репаративных возможностях организма и готовности больного к выполнению эффективной операции по пластическому закрытию ожоговых ран. При поступлении в Ожоговый центр у ряда тяжелообожженных пациентов выявлен глубокий дефицит общих гемопоэтических стволовых клеток $CD45^{+}CD34^{+}$ ($0,022 \pm 0,003$ %, $p=0,0002$), в том числе ранних субпопуляций ГСК $CD45^{dim}CD34^{+}CD38^{-}$ ($p < 0,05$), что свидетельствовало о подавлении компенсаторно-приспособительных реакций гемопоэза и репарации в условиях выраженного инфекционно-воспалительного процесса и эндогенной интоксикации организма. Стойкий дефицит ГСК сохранялся у больных с обширными и глубокими ожогами площадью более 50% поверхности тела при неблагоприятном течении ожоговой болезни с медленным заживлением ожоговых ран, лизисом аутодермотрансплантатов и вялыми грануляциями нередко на фоне наличия стойкой инвазивной раневой инфекции и гнойно-септических осложнений. Напротив, у пациентов при проведении активного хирургического лечения и выполнении успешной аутодермопластики ожоговых ран в процессе комплексного лечения восстановление ГСК до уровня здоровых доноров происходило быстрее, в среднем на 20-е сутки после аутодермопластики. Анализ различных фенотипов циркулирующих ГСК показал их потенциальное влияние на заживление ожоговых ран и течение инфекционного процесса при ожоговой болезни. В дальнейшем это может иметь решающее значение для успешного использования

биотехнологических методов и клеточных технологий в комплексном лечении ожогов.

Успех хирургического лечения во многом определяет эффективность всего комплексного подхода в оказании специализированной медицинской помощи пострадавшим с ожогами. При этом, как показывает проведенное исследование, важными составляющими комплексного лечения являются иммунодиагностика осложнений ожоговой болезни. В то же время иммунный анализ позволяет обеспечить не только раннюю высокоточную диагностику септических осложнений, но и выявлять наиболее поврежденные звенья иммунной системы для использования своевременной персонализированной иммунокоррекции в комплексном лечении тяжелообожженных.

Среди наиболее изученных и эффективных препаратов для иммунозаместительной терапии широко используются препараты иммуноглобулинов человека нормальных для внутривенного введения в комплексной терапии и для профилактики различных иммунодефицитных, гнойно-септических, воспалительных и инфекционных заболеваний.

Учеными Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского и ЗАО «Иммуно – Гем» с нашим участием разработан отечественный препарат Габриглобин®-IgG - иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения с высоким содержанием нативного IgG, обладающего высокой активностью против патогенов и бактериальных токсинов. Однако, исследования эффективности Габриглобина у больных при обширных ожогах не проводились. В этой связи, изучена клинико-иммунологическая эффективность применения Габриглобина для профилактики и лечения сепсиса у 50 пациентов с общей площадью термического поражения более 30% поверхности тела и ожоговой болезнью в стадии ожоговой токсемии и ожоговой септикотоксемии. Основная группа «профилактика сепсиса» - 15 пациентов получили «Габриглобин-IgG» в дозе по 50 мл. (2,5 г.) в\в

ежедневно, курс 5 дней - суммарная доза 250 мл (12,5 г), а основная группа «лечение сепсиса» - 15 пациентов получили 10-дневный курс внутривенных инфузий по 50 мл (2,5 г.) ежедневно с общим объемом полученного препарата 500 мл (25 г). В соответствующие группы контроля «профилактики» и «лечения» сепсиса вошло по 10 больных без включения в комплексную терапию габриглобина. Пациенты всех групп были сходны по диагнозу, полу и возрасту. Результаты иммунологических исследований пациентов проанализированы в исходный период, через 5 и 10 суток от начала лечения, а клинико–лабораторные исследования (биохимический, гематологический, бактериологический анализы, изучение острофазовых реактантов) – в более частые сроки лечения.

Критериями эффективности препарата габриглобин служили: динамика клинической картины ожоговой болезни, изменений иммунограммы и лабораторных параметров, частота развития осложнений и уровень летальности. Применение габриглобина для лечения сепсиса или профилактики генерализации инфекции у больных с ожогами, в сравнении с группой контроля без включения этого препарата, обеспечивало эффективное иммунозаместительное действие с быстрым восстановлением исходно низкого уровня иммуноглобулина IgG. При этом показано четкое иммуномодулирующее влияние препарата на целый ряд ключевых показателей иммунного статуса: уменьшение сдвига формулы крови влево, снижение маркеров иммунной гиперактивации (CD70+, CD64+) и эндогенной интоксикации, а также купирование дефицита общих лимфоцитов, NK-клеток и Т–лимфоцитов.

Суммарная эффективность терапии габриглобином по клинико–лабораторным данным оказывается достаточно высокой. При лечении ожогового сепсиса она составила в среднем 79%, а при его профилактике – в среднем в 72% наблюдений.

Способность современных препаратов внутривенных иммуноглобулинов не только возмещать дефицитные факторы гуморального

иммунного ответа, но и оказывать иммуномодулирующий эффект, купировать развитие системного воспаления и другие изменения гомеостаза, позволяет рассматривать их применение в качестве эффективного лекарственного средства этиопатогенетической направленности при тяжелой ожоговой травме и септических осложнениях ожоговой болезни.

Проведены исследования по оценке эффективности комплексного лечения ожоговой болезни и ее осложнений с использованием персонализированной иммунокоррекции у тяжелообожженных на основе анализа иммунофенотипических маркеров лимфоидных и фагоцитарных клеток, которые ранее в работе не учитывались. В этой связи был расширен фенотипический анализ иммунного статуса пациентов за счет изучения перспективных маркеров, позволяющих всесторонне и функционально оценить индивидуальный характер нарушений иммунной системы у каждого пациента. Такой высокоточный и прогностически надёжный анализ дает возможность объективной интерпретации этих нарушений, что может оказаться очень важным и ценным не только для выбора тактики иммунокоррекции, но и для других видов патогенетической терапии ожоговой болезни и её осложнений.

Были подобраны маркеры с экспрессией HLA-DR+ антигенов ГКГС, субпопуляций естественных киллеров, Т-киллеров, Т-регуляторных лимфоцитов, клетки с экспрессией L-селектинов, адгезионных молекул, рецепторов комплемента, эндотоксинов бактерий и ЛПС, аналогов рецептора ФНО, а также общие лимфоциты, гранулоциты и моноциты с соответствующими фенотипическими маркерами, различные иммунные индексы, представляющие соотношения ключевых клеток иммунной системы.

Впервые обнаружено в общем пуле CD40+ лимфоцитов две субпопуляции-1 и 2. Высказано предположение о возможном присутствии В-лимфоцитов - памяти в субпопуляции - 2. Показана четкая связь между уровнем общих В-лимфоцитов и CD40+ - субпопуляцией - 2. У всех

пациентов (в 100% случаев), имеющих высокий уровень В-лимфоцитов, отмечено достоверное увеличение и CD40+ субпопуляции - 2. Кроме того показано, что в популяции CD21+CD40+ основную часть (около 97%) составляют именно В-лимфоциты (CD21+). В ряде наблюдений, в зависимости от состояния пациента, процент клеток, несущих этот маркер, в данной популяции значительно увеличивался, по-видимому, за счет миграции в этот пул определенных Т-клеток, несущих CD40+ молекулы. Выявленный феномен представляет интерес для интерпретации иммунного статуса при ожогах, тем более что маркеру CD40 принадлежит существенная роль в контактных взаимодействиях между Т- и В-клетками. CD40 молекулы индуцируют ряд важных иммунных реакций гуморального типа: пролиферацию и дифференцировку В-клеток, синтез определенных классов иммуноглобулинов, развитие клеток памяти и др. CD40 играет важную роль в выживаемости и росте В-клеток, а передача сигнала через CD40 спасает В-клетку от индуцированного апоптоза, обеспечивает переключение синтеза различных классов иммуноглобулинов. Очень существенно, что аналогичный сигнал генерируется в макрофагах, эндотелиоцитах и фибробластах и включает активационные события, важные для осуществления воспалительной реакции и репарации [58, 87, 91, 204].

Впервые использованы иммунные индексы - соотношения клеток с экспрессией маркеров активации (CD25, HLA-DR), адгезии (CD11b) и апоптоза (CD95), отражающие состояние иммунной системы (истощение, функциональная активность иммунокомпетентных клеток).

Таким образом, разработка и внедрение в комплексное лечение больных с обширными ожогами инновационных методов иммунодиагностики гнойно-септических осложнений ожоговой болезни, оценки регенераторного потенциала, персонализированной иммунокоррекции позволяет своевременно и эффективно применять хирургические технологии, и тем самым улучшить результаты лечения у данной категории больных.

ВЫВОДЫ

1. Анализ иммунного статуса позволяет своевременно выявлять количественные и функциональные нарушения иммунной системы на этапах комплексного лечения больных с обширными ожогами, в зависимости от тяжести травмы и стадии ожоговой болезни.
2. У больных с площадью ожогового поражения более 30% поверхности тела развиваются гиперактивация и супрессия иммунной системы, о чем свидетельствуют достоверное повышение ($p < 0,05$) количества лейкоцитов, палочко-ядерных нейтрофилов, гранулоцитов с экспрессией высокоаффинного Fc γ -рецептора (CD64+) и рецептора к ЛПС (CD14+) при одновременном достоверном снижении ($p < 0,05$) уровня общих лимфоцитов, естественных киллерных (NK) лимфоцитов, HLA-DR+ моноцитов, иммуноглобулина G.
3. Разработанная количественная иммунная формула прогноза и диагностики сепсиса у больных с обширными ожогами: лимфоциты ($< 9,3 \%$); NK- клетки ($< 5,0 \%$); HLA-DR+ моноциты ($< 50,0 \%$); IgG ($< 6,0 \text{ г/л}$); палочко-ядерные нейтрофилы ($> 21,0 \%$); ЛИИ ($> 4,0 \text{ ЕД}$); CD64+ гранулоциты (90 - 100 %) показала высокую (до 95%) специфичность и возможность раннего (до 7 суток) прогнозирования развития септических осложнений ожоговой болезни.
4. На основе модифицированного многопараметрического анализа циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток получены достоверные ($p < 0,05$) различия содержания фенотипов ГСК в периферической крови здоровых доноров и больных с ожогами. Нормализация общих CD45⁺CD34⁺ ($p=0,03$) и ранних CD45^{dim}34⁺38⁻ ($p=0,02$) популяций циркулирующих гемопоэтических клеток на этапах хирургического лечения глубоких ожогов свидетельствует о восстановлении регенераторного потенциала организма и

подтверждает значение активной хирургической тактики в эффективности комплексного лечения больных с обширными ожогами.

5. Показана эффективность мониторинга состояния иммунной системы с применением современных методов иммунодиагностики для определения тактики хирургического лечения по восстановлению кожного покрова на этапах комплексного лечения больных с обширными ожогами. Своевременное удаление нежизнеспособных тканей и восстановление целостности кожного покрова с использованием современных методов хирургического и местного лечения ожоговых ран сопровождалось нормализацией показателей иммунного статуса и регенераторного потенциала в среднем на $40,8 \pm 2,9$ сутки после ожоговой травмы, что позволило предотвратить развитие септических осложнений у 78,2% пациентов.

6. Клинико-иммунологическая эффективность иммунотерапии препаратом «Габриглобин-IgG» в комплексном лечении больных с обширными ожогами при профилактике сепсиса составила 72 %, а для его лечения – 79 %, что оказалось в 1,9 и 2,5 раза выше в сравнении с результатами профилактики и лечения сепсиса у пациентов без иммуноглобулина.

7. Применение инновационных методов иммунодиагностики и персонализированного алгоритма иммунокоррекции позволили своевременно и эффективно проводить хирургическое лечение по пластическому восстановлению кожного покрова, сократить частоту гнойно-септических осложнений в 1,6 раза и улучшить результаты комплексного лечения больных с тяжелой ожоговой травмой.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано пациенту с обширными ожогами, при наличии возможности, проводить комплексное исследование иммунного статуса современными методами для своевременной диагностики и иммунокоррекции иммунодефицита.
2. Для ранней диагностики и прогноза ожогового сепсиса у больных с обширными ожогами рекомендована следующая иммунная формула (конкретные числовые значения мультиплексной панели иммунных маркеров):

Лимфоциты < 9,3 %

Палочко-ядерные нейтрофилы > 21%

Индекс эндогенной интоксикации (ЛИИ) > 4 ЕД

Естественные киллеры < 5 %

CD64+ гранулоциты 90 - 100 %

HLA-DR+ моноциты < 50%

IgG < 6 г\л

3. У пациентов с площадью ожогового поражения более 30% поверхности тела рекомендован динамический мониторинг иммунного статуса и регенераторного потенциала в качестве дополнительных и важных объективных критериев комплексного лечения и определения тактики, сроков и объема хирургического лечения по пластическому закрытию ожоговых ран.
4. В качестве иммунотерапии рекомендовано применение препаратов иммуноглобулинов нормальных человеческих для внутривенного введения у пациентов с обширными ожогами с иммунозаместительной целью при лабораторном подтверждении иммунодефицита.
5. Для профилактики и лечения сепсиса у пациентов с обширными ожогами рекомендовано своевременное использование препаратов иммуноглобулина нормального человеческого для в\в введения в дозах 0,2-0,4 г/кг.

6. Для достижения наилучшего результата лечения ожоговой болезни на фоне проводимой комплексной терапии, этапного хирургического и местного лечения ожоговых ран режим применения препаратов иммуноглобулинов нормальных человеческих для внутривенного введения и решение вопроса о необходимости проведения повторных курсов иммунокоррекции должны основываться на персонализированном подходе, учитывая как тяжесть ожоговой травмы, так и нарушения иммунного статуса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген

АДП – аутодермопластика

ВВИГ – внутривенные иммуноглобулины

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа

ГКГС - главный комплекс гистосовместимости

Гр – гранулоциты

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИЛ (IL) – интерлейкины (цитокины)

ИРИ – иммунорегуляторный индекс

ИС - индекс сдвига

ИСЛК - индекс сдвига лейкоцитов

ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации

Лк - лейкоциты

ЛПС – липополисахарид

ЛФ – лимфоциты

МКАТ- моноклональные антитела

Мн – моноциты

Нф – нейтрофилы

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

П.т. – поверхность тела

П/Я Нф – палочкоядерные нейтрофилы

СИН – степень иммунной недостаточности

СИС – степень иммунной стимуляции

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СПОН – синдром полиорганной недостаточности

СРП – С-реактивный протеин

T_H-1 – Т-хелперный лимфоцит первого типа

T_H-2 - Т-хелперный лимфоцит второго типа

ФНО - фактор некроза опухолей

ХЛ – хемилюминесценция

ХО+АДП - хирургическая обработка и аутодермопластика

CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) – синдром системного компенсированного противовоспалительного ответа

CD – кластер дифференцировки

DAMP (damage-associated molecular patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

FDA (Food and Drug Administration) — управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств

Ig (G, A, M) – иммуноглобулины классов G, A, M

NK – клетки – натуральные (естественны) киллеры

PAMP (pathogen-associated molecular patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

S – площадь ожога

SIRS (systemic inflammatory response syndrome) – синдром системного воспалительного ответа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев А.А. Ожоговый сепсис: диагностика, профилактика, лечение. Диссертация доктора мед. наук. М. 1993; 233.
2. Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Богданов В.В. Оценка эффективности инновационных технологий лечения пострадавших от ожогов. Медицинский алфавит. 2020; 13: 44–47.
3. Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Яковлев В.П. Ожоговая инфекция. Этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение. М.: Вузовская книга. 2010; 416.
4. Алексеев А.А., Салахиддинов К.З., Гаврилюк Б.К., Тюрников Ю.И. Комплексное лечение глубоких ожогов на основе применения хирургической некрэктомии и современных биотехнологических методов. Анналы хирургии. 2012; 6: 41-45.
5. Алексеев А.А., Ушакова Т.А., Крутиков М.Г., Бобровников А.Э. Маркеры сепсиса в диагностике адаптивного воспаления при ожоговой травме. Лечение и профилактика. 2015; 2: 14: 84-91.
6. Атлас клеток крови и костного мозга / Под ред. проф. Г.И. Козинца. – М., «Триада», 1998. – 160 с.
7. Белоцкий С.М., Снастина Т.И. Роль опсоно-фагоцитарной системы в патогенезе сепсиса. Терапевтический архив. 1988; 5: 97-99.
8. Белоцкий С.М., Снастина Т.И., Филюкова О.Б. Микробный фактор в хемилюминисценции нейтрофилов периферической крови больных с гнойной хирургической инфекцией. Журнал микробиология, эпидемиология и иммунология. 1988; 8: 87-90.
9. Бобров Н.Н. Лабораторные методы исследования на туберкулез. Справочное руководство для врачей. М., 1952.
10. Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М. и др. Оценка параметров клеточного иммунитета у обожженных //

- Профилактическая и клиническая медицина. — 2020. — № 2 (75). — С. 80–86.
11. В.М. Земсков, А.А. Алексеев, М.Н. Козлова, и др. Изучение клинико-иммунологической эффективности иммунозаместительной терапии габриглобином при лечении ожоговой болезни и её осложнений. // РМЖ. - 2012, Т.20, №5, С. 216-222.
 12. Вилявин Г.Д., Шумова О.В. Патогенез и лечение ожоговой болезни. М: Медгиз, 1963. - 276 с.
 13. Голобоков Г.С., Зиновьев Е.В., Костяков Д.В., Лиознов Д.А. Современные лабораторные биомаркеры ожогового сепсиса // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2018. № 4. С. 59–67.
 14. Земсков А. М., Земсков В. М. Коротких И. Н. и др. Иммунные расстройства и их коррекция при гнойно-воспалительных процессах. Издат. «Триада-Х»- М., 2007. - 159 с.
 15. Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В. Клиническая иммунология: учебник/ под ред. А.М. Земскова. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008. – 432 с.
 16. Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В., Новикова Л.А. Клиническая иммунология и аллергология. Краткий справочник: Учебное пособие. – Воронеж: ВГУ, 1997. – 160 с.
 17. Земсков А.М., Земсков В.М., Черешнев В.А. и др. Руководство по клинической иммунологии для практических врачей. – М.: Триада-Х, 2011.
 18. Земсков В. М., Алексеев А. А., Козлова М. Н., и др. Иммунная диагностика септических осложнений при ожогах // Успехи современной биологии - 2015. - Том 135, № 6, с.531-541.

19. Земсков В.М., Козлова М.Н., Барсуков А.А., Шишкина Н.С., Земсков А.М., Алексеев А.А., Демидова В.С. Актуальность исследования лимфоидных и фагоцитарных клеток различных фенотипов при ожоговой болезни. //Российский Аллергологический Журнал.// 2017. № 1 . стр. 64-66.
20. Зиновьев Е. В. Термические и химические поражения / Е. В. Зиновьев // Факультетская хирургия: Учебник для вузов. В 2 частях. Москва: "Издательство ЮРАЙТ", 2016. – С. 264-280.
21. Зиновьев Е.В., Дергунов А.В., Кобиашвили М.Г. и др. Особенности иммунопатогенеза и критериальная иммунодиагностика сепсиса у тяжелообожженных // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2021. № 2. С.95–103. DOI: 10.25016/ 2541-7487-2021-0-2-95-103
22. Исследование системы крови в клинической практике / под ред. Г. И. Казинца и В. А. Монрова. – М.: Триада-Х, 1997. – 301 с.
23. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении. Врачебное дело. 1941. № 1. С. 31-35.
24. Карелин А.А., Алексеев, А.А., Глоба А. Г., Демидова В. С., Цветков В. О. Энзиматическая продукция супероксида полиморфно-ядерными лейкоцитами человека при ожоговой болезни. Вопросы медицинской химии. 1988; 34: 5: 107-110.
25. Клинические рекомендации: «Ожоги термические и химические. Ожоги солнечные. Ожоги дыхательных путей». 2021. Доступно по: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/687_1. Ссылка активна на 01.04.2023.
26. Козлова М.Н., Алексеев А.А., Земсков В.М., Бобровников А.Э., Шишкина Н.С., Куликова А.Н., Демидова В.С., Соловьева М.С. Оценка эффективности хирургического лечения пациентов с обширными ожогами на основе исследования иммунного статуса.

Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2025; 18: 1: 9-18.

27. Козлова М.Н., Земсков В.М., Алексеев А.А. Иммунодиагностика и иммунотерапия ожогового сепсиса. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2023; 16: 3: 261-271.
28. Козлова М.Н., Земсков В.М., Алексеев А.А., Демидова В.С., Шишкина Н.С., Куликова А.Н., Земсков А.М., Бобровников А.Э. Исследование гемопоэтических стволовых клеток у больных с обширными ожогами. // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2022. Том XV, №4, с. 300-305.
29. Козлова М.Н., Земсков В.М., Шишкина Н.С., Барсуков А.А., Демидова В.С., Алексеев А.А. Персонифицированный алгоритм иммунокоррекции внутривенными иммуноглобулинами для профилактики и лечения осложнений ожоговой болезни на основе комплексного анализа иммунного статуса. // Российский иммунологический журнал – 2020 – Том 23, №4, С. 523-528.
30. Колкер И.И. Актуальные вопросы проблемы «Инфекция и иммунитет при термических поражениях»// Актуальные вопросы хирургии: Сборник научных трудов Института хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР. М., 1985. С.144-149.
31. Колкер И.И. Иммунологические аспекты ожоговой болезни. III Всесоюзная конференция «Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни». 1986; 191-193.
32. Крутиков М.Г. Инфекция у обожженных: этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение. Диссертация доктора медицинских наук. - М., 2005. -371 с.
33. Лавров В.А. Алексеев А.А. Комбустиология: вопросы истории. Комбустиология (электронный журнал). 2000. №4.

- 34.Латышева Т.В. Принципы заместительной терапии внутривенными иммуноглобулинами. Цитокины и воспаление. 2005; 4: 3: 58 – 62.
- 35.Лукоянова Т.Н. Клинико-иммунологические критерии обоснования и оценки эффективности иммуннокорригирующей терапии у больных ожоговой болезнью: Диссертация канд.мед.наук. – М., 1990. - 121 с.
- 36.Оптимизация диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний (инновационные технологии). Под ред. Ревивили А.Ш., Земскова В.М., Земскова А.М. Санкт-Петербург: СпецЛит. 2020; 319.
- 37.Островский В.К., Мащенко А.В., Янголенко Д.В., и др. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях. Клин. лаб. диагностика. – 2006. — № 6. – С. 50-53.
- 38.Пивоварова Л.П., Арискина О.Б., Ассур М.В. и др. Иммунотерапия сепсиса у пострадавших с тяжелой ожоговой травмой. Медицинская иммунология.1999; 1: 3-4: 126-127.
- 39.Ревивили А.Ш., Оловянный В.Е., Сажин В.П., Анищенко М.А., Кузнецов А.В., Миронова Н.Л., Шелина Н.В. Хирургическая помощь в Российской Федерации. М. 2021; 180.
- 40.Сергель О.С., Морозов С.С. К вопросу о значении при ожоговой болезни тестов местной клеточной гиперчувствительности//3-я Всесоюзная конференция по проблеме «Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни»: Тез. докл. - М., 1986. - С.204-206.
- 41.Столбовая А.Ю., Смирнов И.В., Самойлович М.П. Стресс-индуцированные молекулы МІСА и МІСВ в онкологии. Медицинская иммунология. 2022;24(3):433-454.

42. Ушакова Т.А. Адаптивные реакции у тяжело обожженных в условиях интенсивной терапии. Диссертация доктора мед. наук. М., 2008. - 268 с.
43. Федоров В.Д., Ривкин В.Л., Гурсева Х.Ф., Мартынова Т.Н. Современные взгляды на течение раневого процесса и лечение ран//Хирургия. – 1975. - N 4. – С.136-141.
44. Юшков Б.Г., Данилова И.Г., Козакова И.А. Роль стволовых клеток в регенерации печени и почек // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2013. - № 1 (43). – С.46-48.
45. Яблучанский Н.И., Пилипенко В.А., Кондратенко П.Г. Индекс сдвига лейкоцитов крови как маркер реактивности организма при остром воспалении. Лабораторное дело. 1983. № 1. С. 60—61.
46. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2008. - № 1. - С. 2-7.
47. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. – Екатеринбург 2016. - 282с.
48. Alejandria MM, Lansang MA, Dans LF, Mantaring JB 3rd. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Sep 16;2013(9):CD001090.
49. Alsaqabi F., Ahmed Z. The accuracy of prehospital fluid resuscitation of burn patients: A Systematic Review. Eur. Burn J. 2022;3:517–526.
50. Armenian S.H., Sun C.L., Vase T. et al. Cardiovascular risk factors in hematopoietic cell transplantation survivors: role in development of subsequent cardiovascular disease // Blood. - 2012. – Vol. 120. – P. 4505-4512.

51. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* (London, England). 1993;341(8844):515–518.
52. Auger C., Samadi O., Jeschke M.G. Biochemical alterations underlying post-burn hypermetabolism. *Biochem. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2017;1863:2633–2644.
53. Azzopardi E.A., Azzopardi E., Camilleri L., et al. Gram-negative wound infection in hospitalized burn patients-systematic review and metanalysis. *PLoS ONE.* 2014; 9:e95042.
54. Bahemia I.A., Muganza A., Moore R., Sahid F., Menzes C.N. Microbiology and antibiotic resistance in severe burns patients: A 5-year review in an adult burn's unit. *Burns.* 2015;41:1536–1542.
55. Baker K.S., Bhatia S., Bunin N. et al. NCI, NHLBI first international consensus conference on late effects after pediatric hematopoietic cell transplantation: state of the science, future directions // *Biological Blood Marrow Transplantation.* - 2011. - Vol. 17. - P.1424-1427.
56. Baldridge MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature.* 2010;465:793–797.
57. Baldridge MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* 2011;32(2):57-65.
58. Banchereau J, Dubois B, Fayette J, et al. Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts. *Adv Exp Med Biol.* 1995;378:79-83.
59. Barth PJ, Westhoff CC. CCR34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2:221–227.
60. Baumann H., Gauldie J. The acute phase response. *Immunol. Today.* 1994;15:74–80.
61. Blakaj A, Bucala R. Fibrocytes in health and disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5:S6.

62. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 2000;37:1141–1149.
63. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996; 24:1125–1128.
64. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011; 306: 2594–2605.
65. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: A multiplex analysis. *Crit Care.* 2007; 11(2): R49.
66. Brandt J.E., Srour E.F., van Besien K., Hoffman R. Characterization of human hematopoietic stem cells // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1990. – Vol. 352. – P. 29-36.
67. Cabral L., Afreixo V., Santos F., Almeida L., Paiva J.A. Procalcitonin for the early diagnosis of sepsis in burn patients: A retrospective study. *Burns.* 2017;43:1427–1434.
68. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008;3:229–230.
69. Caress JB, Kennedy BL, Eickman KD. Safety of intravenous immunoglobulin treatment. *Expert Opin Drug Saf.* 2010;9:971–979.
70. Church D, Elsayed S, Reid O, et al. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:403–434
71. Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell.* 2012; 10: pp. 690-697.
72. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3:301–313.
73. Curran TA, Ghahary A. Evidence of a role for fibrocyte and keratinocyte-like cells in the formation of hypertrophic scars. *J Burn Care Res.* 2013;34:227–231.

74. Cutuli SL, Carelli S, Grieco DL, De Pascale G. Immune Modulation in Critically Ill Septic Patients. *Medicina (Kaunas)*. 2021 May 31;57(6):552.
75. D'Avignon LC, Hogan BK, Murray CK, et al. Contribution of bacterial and viral infections to attributable mortality in patients with severe burns: an autopsy series. *Burns*. 2010; 36: 6: 773–779.
76. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204–2213.
77. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving sepsis guidelines for severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32: 858–873.
78. Dellinger RP, Hussain S. From Barcelona to New York: 15 years of transition of sepsis performance improvement. *J Thorac Dis*. 2017 Oct; 9(10):3453-3455.
79. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013; 39: 165–228.
80. Demidova-Rice T.N., Durham J.T., Herman I.M. Wound healing angiogenesis: Innovations and challenges in acute and chronic wound healing. *Adv. Wound Care*. 2012;1:17–22.
81. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317.
82. Du Clos TW. C-reactive protein and the immune response. *Sci Med*. 2002; 8: 108–117.
83. Dupuy A-M, Philippart F, Pean Y, et al. Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review: I – currently

- available biomarkers for clinical use in acute infections. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):22.
- 84.Durandy A, Kaveri S V, Kuijpers T W, et al. Intravenous immunoglobulins-understanding properties and mechanisms. *Clin. Exp. Immunol*. 2009, Vol. 158, Suppl 1, pp. 2-13.
 - 85.Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concept, definition, and the new reality. *Blood*. 2015; 125, pp. 2605-2613
 - 86.Ebert G. Immunity by equilibrium. *Nature Rev Immunol*. 2016; 16: 524–32.
 - 87.Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):152-172.
 - 88.Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 514–25.
 - 89.Essmann L, Wirz Y, Gregoriano C, Schuetz P. One biomarker does not fit all: tailoring anti-infective therapy through utilization of procalcitonin and other specific biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2023 Jul-Dec;23(9):739-752.
 - 90.Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock, 2021. *Intensive Care Med*. 2021; Nov; 47: 11: 1181-1247.
 - 91.Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*. 2003 Nov 1;171(9):4621-4629.
 - 92.Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: Results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med*. 2014; 42: 1749–1755.

93. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. *Nature Rev Genet.* 2010;11: 47–59.
94. Fontaine M, Lepape A, Piriou V, Venet F, Friggeri A. Innate danger signals in acute injury: from bench to bedside. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2016;35:283–292.
95. Galeotti C, Kaveri SV, Bayry J. IVIG-mediated effector functions in autoimmune and inflammatory diseases. *Int Immunol.* 2017;29(11):491-498.
96. Gallacher L., Murdoch B., Wu D.M., et al. Isolation and characterization of human CD34 – Lin – and CD34 + Lin- hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 // *Blood.* – 2000. – Vol. 95. – P. 2813–2820.
97. Gibot S, Béné MC, Noel R, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(1):65-71.
98. Gilardin L, Bayry J, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin as clinical immune-modulating therapy. *CMAJ.* 2015;187(4):257-264.
99. Girardot T, Rimmele T, Venet F, Monneret G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis.* 2017; 22: 2: 295–305.
100. Greenhalgh DG, Saffle JR, Holmes JH, et al. American Burn Association Consensus Conference to define sepsis and infection in burns. *J Burn Care Res.* 2007; 28: 776–790
101. Greenhalgh DG. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. *Burns Trauma.* 2017; Aug; 8: 5: 23.
102. Grieb G, Steffens G, Pallua N, Bernhagen J, Bucala R. Circulating fibrocytes – biology and mechanisms in wound healing and scar formation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;291:1–19.

103. Halstead ES, Carcillo JA, Schilling B, et al. Reduced Frequency of CD56^{dim} CD16^{pos} Natural Killer Cells in Pediatric Systemic Inflammatory Response Syndrome/Sepsis Patients. *Pediatr Res* (2013) 74(4):427–432.
104. Hawkins H.K., Jay J., Finnerty C.C. Pathophysiology of the burn scar. *Total Burn. Care*. 2018:466–475.e463.
105. Hedegaard SS, Wisborg K, Hvas A-M. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis – a systematic review. *Infect Dis* (London, England). 2015;47(3):117–124.
106. Henriquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:547818.
107. Hogan BK, Wolf SE, Hospenthal DR, et al. Correlation of American Burn Association sepsis criteria with the presence of bacteremia in burned patients admitted to the intensive care unit. *J Burn Care Res*. 2012; 33(3):371-378.
108. Hooper JA. Intravenous immunoglobulins: evolution of commercial IVIG preparations. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008;28:765–778.
109. Hotchkiss RS, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001;166 (11):6952–6963.
110. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348: 138–150.
111. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Rev Immunol*. 2013;13: 862–874.
112. Hsu KH, Chan MC, Wang JM, Lin LY, Wu CL. Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology*. 2011;16(1):152–160.

113. Jahandideh B, Derakhshani M, Abbaszadeh H, et al. The pro-Inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum Immunol.* 2020;81(5):206-217.
114. Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, et al. Burn injury. *Nat Rev Dis Prim.* 2020; 6: 1–25.
115. Johnson C. Management of burns. *Surgery.* 2018; 36:435–440.
116. Johnson M.R., Reg R. Partial-Thickness burns: Identification and management. *Adv. Ski. Wound Care.* 2003;16:178–187.
117. Jolles S. A review of high-dose intravenous immunoglobulin (hdIVIg) in the treatment of the autoimmune blistering disorders. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26(2):127-131.
118. Junaidi K., Mustafa A.U., Arshadm S., et al. Burn wound infections: A serious threat of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pak. J. Med. Health Sci.* 2019;13:804-807.
119. Kahn JM, Le T, Angus DC, et al. ProVent Study Group Investigators. The epidemiology of chronic critical illness in the United States. *Crit Care Med.* 2015; 43: 282–287.
120. Kao HK, Chen B, Murphy GF, Li Q, Orgill DP, Guo L. Peripheral blood fibrocytes: enhancement of wound healing by cell proliferation, re-epithelialization, contraction, and angiogenesis. *Ann Surg.* 2011;254:1066–1074.
121. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA.* 2014; 311:1308–1316.
122. Kaur A, Sethi GK, Goyal RK, et al. Thrombocytopenia in paediatric ICU: Incidence, transfusion requirement and role as prognostic indicator. *J Clin Diagnost Res.* 2015; 9: 5–7.

123. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. 2005; 36: 691–709.
124. Khalaf F, Touma D, Pappas A, Hatim L, Wojtowicz-Piotrowski S, Jeschke MG. Decoding burn trauma: biomarkers for early diagnosis of burn-induced pathologies. *Biomark Res*. 2024 Dec 23;12(1):160.
125. Kida A. and McDonald G.B. Gastrointestinal, hepatobiliary, pancreatic, and ironrelated diseases in longterm survivors of allogeneic hematopoietic cell transplantation // *Seminars in Hematology*. - 2012. – Vol. 49 (1). – P. 43-58.
126. Kim WJ. Cellular signaling in tissue regeneration. *Yonsei Med J*. 2000;41:692–703.
127. King KY, Goodell MA. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):685-692.
128. Kirouac DC, Madlambayan GJ, Yu M, et al. Cell-cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. *Mol Syst Biol*. 2009;5:293.
129. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997;11:2049–2054.
130. Kjaergaard AG, Nielsen JS, Tonnesen E, Krog J. Expression of NK Cell and Monocyte Receptors in Critically Ill Patients–Potential Biomarkers of Sepsis. *Scand J Immunol* (2015) 81(4):249–258.
131. Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, et al. Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care*. 2007; 11(2): R38.

132. Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Mali AB. Protein interactions at endothelial junctions and signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Circ Res.* 2017; 120: 179–206.
133. Krysko D.V., Agostinis P., Krysko O., et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32:157–164.
134. Kuci S. et al. Identification of a novel class of human adherent CD34-stem cells that give rise to SCI repopulating cells // *Blood.* - 2003. – Vol. 101. - P. 869-876.
135. Lachiewicz A.M., Hauck C.G., Weber D.J., Cairns B.A., van Duin D. Bacterial infections after burn injuries: Impact of multidrug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65:2130–2136.
136. Ladhani HA, Yowler CJ, Claridge JA. Burn Wound Colonization, Infection, and Sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2021 Feb;22(1):44-48.
137. Lamas D. Chronic critical illness. *N Engl J Med.* 2014; 370: 175–177.
138. Larouche J., Sheoran S., Maruyama K., Martino M.M. Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv. Wound Care.* 2018;7:209–231.
139. Laupland KB, Kirkpatrick AW, Delaney A. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the treatment of severe sepsis and septic shock in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2007 Dec;35(12):2686-92
140. Lee KC, Joory K, Moiemmen NS. History of burns: The past, present and the future. *Burn Trauma* 2014;2:169–180.
141. Libregts SF, Nolte MA. Parallels between immune driven-hematopoiesis and T cell activation: 3 signals that relay inflammatory stress to the bone marrow. *Exp Cell Res.* 2014;329(2):239-247.

142. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? *Transfus Med Hemother*. 2010;37:75–83.
143. Litman GW, Rast JP, Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature Rev Immunol*. 2010; 10: 543–553.
144. Long B, Koyfman A. Ready for prime time? Biomarkers in sepsis. *Emerg Med Clin North Am*. 2017;35(1):109–122.
145. Lopez ON, Cambiaso-Daniel J, Branski LK, Norbury WB, Herndon DN. Predicting and managing sepsis in burn patients: current perspectives. *Ther Clin Risk Manag*. 2017 Aug 29; 13: 1107-1117.
146. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med*. 2009;37:2746–2752.
147. Lutz HU, Stammers P, Jelezarova E, Nater M, Späth PJ. High doses of immunoglobulin G attenuate immune aggregate-mediated complement activation by enhancing physiologic cleavage of C3b in C3bn-IgG complexes. *Blood*. 1996; 88: 184-193.
148. Manning J. Sepsis in the burn patient. *Crit. Care Nurs. Clin. N. Am*. 2018;30:423–430.
149. Mann-Salinas EA, Baun MM, Meininger JC, et al. Novel predictors of sepsis outperform the American Burn Association sepsis criteria in the burn intensive care unit patient. *J Burn Care Res*. 2013;34(1):31-43.
150. McConnell KW, Coopersmith CM. Organ failure avoidance and mitigation strategies in surgery. *Surg Clin N Am*. 2012; 92: 307–319.
151. Medzhitov R. Original physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428–35.
152. Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta*. 2002;323:17–29.

153. Mira J.C., Brakenridge S.C., Moldawer L.L., Moore F.A. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit. Care Clin.* 2017;33:245–258.
154. Mira JC, Gentile LF, Mathias J, et al. Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and the persistent inflammatory-immunosuppression and catabolism syndrome. *Crit Care Med.* 2017; 45: 253–262.
155. Moins-Teisserenc H, Cordeiro DJ, Audigier V, et al. Severe Altered Immune Status After Burn Injury Is Associated With Bacterial Infection and Septic Shock. *Front Immunol.* 2021;12:586195.
156. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006;32:1175–1183.
157. Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, Mattoli S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res.* 2005;304:81–90.
158. Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med.* 2010; 207: pp. 1173-1182.
159. Munster A.M., Hoagland H.C., Pruitt B.A., Jr. The effect of thermal injury on serum immunoglobulins. *Ann. Surg.* 1970;172:965–969.
160. Najafi S, Ghanavat M, Shahrabi S, Gatavizadeh Z, Saki N. The effect of inflammatory factors and their inhibitors on the hematopoietic stem cells fate. *Cell Biol Int.* 2021;45(5):900-912.
161. Nast-Kolb DM, Aufmkolk M, Rucholt S, et al. Multiple organ failure. Still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma.* 2001; 51: 835–841.

162. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM et al. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *J Burn Care Res.* 2017 Jan/Feb;38(1):e469-e481.
163. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol.* 2007;96:179–204.
164. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:126–131.
165. Normansell DE. Human immunoglobulin subclasses. *Diagn Clin Immunol.* 1987;5:115–128.
166. Novelli EM, Ramirez M, Civin CI. Biology of CD34+CD38-cells in lymphohematopoiesis. *Leuk Lymphoma.* 1998;31(3-4):285-293.
167. Nunez Lopez O, Cambiaso-Daniel J, Branski LK, Norbury WB, Herndon DN. Predicting and managing sepsis in burn patients: current perspectives. *Ther Clin Risk Manag.* 2017;13:1107-1117.
168. Orban C. Diagnostic criteria for sepsis in burn patients. *Chirurgia (Bucur).* 2012;107(6):697-700.
169. O’Sullivan ST, O’Connor TP. Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. *Br J Plast Surg.* 1997; 50: 8: 615–623.
170. Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2002; 30: pp. 3-6
171. Oryan A., Alezadeh E., Moshiri A. Burn wound healing: Present concepts, treatment strategies, and future directions. *J. Wound Care.* 2017;26:5–19.
172. Perez EE, Orange JS, Bonilla F, et al. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *J Allergy Clin. Immunol.* 2017, Vol. 139(3S), pp. 1-46.

173. Pfenninger CV, et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells and glioblastoma cells // *Cancer Research*. - 2007. – Vol. 67(12). – P. 5727- 5736.
174. Pietras EM, Passegué E. Linking HSCs to their youth. *Nat Cell Biol*. 2013;15:885–887.
175. Pilling D, Gomer RH. Differentiation of circulating monocytes into fibroblast-like cells. *Methods Mol Biol*. 2012;904:191–206.
176. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev Immunol*. 2007; 7: 803–815.
177. Porter C., Tompkins R.G., Finnerty C.C., et al. The metabolic stress response to burn trauma: Current understanding and therapies. *Lancet*. 2016;388:1417–1426.
178. Pretheeban T, Lemos DR, Paylor B, et al. Role of stem/progenitor cells in reparative disorders. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):20.
179. Pruitt B.A., Polk H.C. Burns and soft tissues. Infection and the surgical patient, Churchill Livingstone. 1982; 4: 113-131.
180. Rani M., Nicholson S.E., Zhang Q., Schwacha M.G. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. *Burns*. 2017;43:297–303.
181. Rea S, Giles NL, Webb S, et al. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound--more than just inflammation. *Burns*. 2009;35:356–364.
182. Rea S, Stevenson A, Giles NL, Wood FM, Fear MW. Cells from the hematopoietic lineage are only present transiently during healing in a mouse model of non-severe burn injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 24;6(1):134.

183. Schneider HG, Lam QT. Procalcitonin for the clinical laboratory: a review. *Pathology*. 2007;39:383–390.
184. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
185. Schroeder T. Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell Stem Cell*. 2010; 6: pp. 203-207.
186. Sengupta S., Sukhtankar A., Dhole T., Dubey K. Humoral immunity in burns. *Burns*. 1982;8:172–175.
187. Sewell WA, Jolles S. Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin. *Immunology*. 2002; 107: 4: 387-393.
188. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med*. 2017 Jun 8;376(23):2235-2244.
189. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 762–774.
190. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy LM, et al. Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:775–787.
191. Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, et al. A prospective multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Crit. Care Med*. 2009; 37: 1: 96-104.
192. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 801–810.

193. Smith KG, Clatworthy MR. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature Reviews Immunology*. 2010; 674: 10: 328-343.
194. Song G, Nguyen DT, Pietramaggiore G, et al. Use of the parabiotic model in studies of cutaneous wound healing to define the participation of circulating cells. *Wound Repair Regen*. 2010;18:426–32.
195. Song K, Li L, Wang Y, Liu T. Hematopoietic stem cells: multiparameter regulation. *Hum Cell*. 2016;29(2):53-57.
196. Stadtfeld M, Graf T. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development*. 2005;132:203–213.
197. Sutherland D.R., Stewart A.K. and Keating, A. CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications // *Stem Cells* (Suppl 3). - 1993. – P. 50-57.
198. Takei S, Arora YK, Walker SM. Intravenous immunoglobulin contains specific antibodies inhibitory to activation of T cells by staphylococcal toxin superantigens. *J. Clin. Invest*. 1993; 91: 2: 602-607.
199. Takizawa H, Manz MG. Impact of inflammation on early hematopoiesis and the microenvironment. *Int J Hematol*. 2017 Jul;106(1):27-33.
200. Tan VSR, Phua J, Lim TK. In sepsis, beyond adherence, timeliness matters. *J Thorac Dis*. 2017 Sep;9(9):2808-2811.
201. Torres MJM, Peterson JM, Wolf SE. Detection of Infection and Sepsis in Burns. *Surg Infect (Larchmt)*. 2021 Feb;22(1):20-27.
202. Ueda Y, Cain DW, Kuraoka M, Kondo M, Kelsoe G. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for

- inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *The Journal of Immunology*. 2009;182 (10):6477–6484.
203. Vaidya A, Kale V. Hematopoietic Stem Cells, Their Niche, and the Concept of Co-Culture Systems: A Critical Review. *J Stem Cells*. 2015;10(1):13-31.
 204. van Kooten C, Banchereau J. Functional role of CD40 and its ligand. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 Aug;113(4):393-399.
 205. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gd T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:88–100.
 206. Venet F, Tissot S, Debard AL, et al. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med*. 2007;35:1910–1917.
 207. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-49.
 208. Vladimir M. Zemskov, Konstantin N. Pronko, Maria N. Kozlova, Alexander A. Barsukov, Nadezhda S. Shishkina, Andrey A. Alekseyev and Valentina S. Demidova. Overview of stem cells and their research in burn patients. *International Journal of Current Research*. 2018. Vol. 10, Issue 01, pp.64731-64736.
 209. Walter D, Lier A, Geiselhart A, et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature*. 2015;520:549–552.
 210. Wang T.Y., Chang S.J., Chang M.D., Wang H.W. Unique biological properties and application potentials of cd34+ cd38- stem cells from various sources // *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 48. – P. 356-369.

211. Ward J., Philips G., Radotra I., et al. Frailty: An independent predictor of burns mortality following in patient admission. *Burns*. 2018;44:1895–1902.
212. Werdan K: Supplemental immune globulins in sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37:341-349.
213. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-- domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 1988;6:381–405.
214. Wingren C, Michaelsen TE, Magnusson CG, Hansson UB. Comparison of surface properties of human IgA, IgE, IgG and IgM antibodies with identical and different specificities. *Scand J Immunol.* 1996 Nov;44(5):430-436.
215. Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The ontogeny of monocyte subsets. *Front Immunol.* 2019;10:1642.
216. World Health Organization. *Burns*. 2018. Доступно по: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Ссылка активна на 01.04.2023.
217. Wu Y, Zhao RC, Tredget EE. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells*. 2010;28:905–915.
218. Xiao M, Dooley DC. Cellular and molecular aspects of human CD34+ CD38- precursors: analysis of a primitive hematopoietic population. *Leuk Lymphoma*. 2000;38(5-6):489-497.
219. Xiao W, Mindronos MN, Seok J, et al. Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011; 208: 2581–2590.
220. Yan J., Hill W.F., Rehou S., et al. Sepsis criteria versus clinical diagnosis of sepsis in burn patients: A validation of current sepsis scores. *Surgery*. 2018;164:1241–1245.

221. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012;35:213–221.
222. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol.* 2010;1:53-59.
223. Zemskov VM, Alekseev AA, Gnatenko DA, Kozlova MN, et al. Composite Biomarker Panel as a Highly Informative and Reliable Tool for Predicting Septic Complications. *Jacobs Journal of Biomarkers.* 2016; 2(1): 016: 1-10.
224. Zemskov VM, Alekseev AA, Kozlova MN, et al. Changes in the immune system depending on the stage of burn disease and the area of thermal destruction. Immunoglobulin replacement therapy with gabriglobin. *International Journal of Recent Scientific Research.* 2017. Vol. 8, Issue, 2, pp. 15653-15662.
225. Zhang P, Zou B, Liou YC, Huang C. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury. *Burns Trauma.* 2021 Feb 4;9:tkaa047.
226. Zhang Q., Raoof M., Chen Y., et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464:104–107.