

На правах рукописи

СЕЛИВАНОВ
Петр Александрович

**ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
ИСХОДА ОЖГОВОЙ ТРАВМЫ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научные руководители:

доктор медицинских наук профессор **Калинина Наталия Михайловна**
кандидат биологических наук доцент **Бычкова Наталия Владимировна**

Официальные оппоненты:

Серебряная Наталья Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория общей иммунологии, заведующая;

Вологжанин Дмитрий Александрович – доктор медицинских наук, доцент, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», заместитель главного врача.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «7» июня 2022 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <https://www.nrcerm.ru>

Автореферат разослан «___»_____2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка новых методов, программ исследования как клеточного, так и молекулярного состава биологических жидкостей человека и их интеграция в практику клинической лабораторной диагностики способствует совершенствованию эффективности лечения заболеваний, сокращению сроков временной нетрудоспособности пострадавших [Долгов В.В., 2012]. В этой связи выявление новых подходов применения клинической лабораторной диагностики в комбустиологии сохраняет свою актуальность [Парамонов Б.А., 2000; Жилинский Е.В. и др., 2014].

В клинической лабораторной диагностике определение клеточного и молекулярного состава крови принято использовать для диагностики и мониторинга обширного спектра заболеваний, в том числе и ожоговой травмы. Общий клинический и биохимические анализы крови в настоящее время используются наиболее часто при ведении пациентов с ожоговой травмой. Наибольшее внимание уделяется общему содержанию лейкоцитов, гемоглобина и наличию палочкоядерных нейтрофилов. В биохимическом анализе обращается внимание [Zhylynskiy E.V., 2015] в первую очередь на уровни печеночных трансаминаз (аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза), а также на представителя группы белков острой фазы – С-реактивного пептида. В целом, принято считать, [Chipp E. et al., 2010; Khalil M.A., 2018] что базовых параметров, определяемых при данных исследованиях, достаточно для адекватного ведения пациентов с ожоговой травмой. Наряду с этим не используется ряд лабораторных показателей, способных углубленно характеризовать состояние организма при течении как ожоговой болезни, так и при подготовке пациента к оперативному вмешательству в виде аутотрансплантации кожного лоскута.

В патогенезе ожоговой травмы (ОТ) большую роль играет взаимодействие врожденного и адаптивного иммунного ответа [Чеснокова Н.П. и др., 2011; Ponomarev A., 2019]. Поражая самый распространенный орган человека – кожу, ожоговая травма запускает каскад последовательных реакций взаимодействия клеток-участников, таких как кератиноциты, лимфоциты, клетки Лангерганса, а также гуморальных факторов, таких как цитокины. В настоящее время уделяется широкое внимание проблеме изучения межклеточного взаимодействия компонентов иммунной системы посредством цитокинов - универсальных медиаторов иммунного ответа. Данные, полученные в научных исследованиях, необходимо внедрять в практику клинической лабораторной диагностики. Ожоговый травматизм представляется одним из ведущих социальных явлений в подавляющем большинстве развитых стран мира [Wang H., Sui M., 2008; Зиновьев Е.В., 2020]. Среди общего числа травм в РФ ожоги занимают 4-е место [Герасимова Л.И., 2002; Алексеев А.А., 2014].

Ведущим методом хирургического лечения поверхностей, пострадавших от ожогов, является свободная аутодермопластика (САДП), подразумевающая под собой перекрытие площади раневого дефекта перфорированным лоскутом кожи. Наряду с возникновением типовых патологических процессов, присущих любому оперативному вмешательству, при САДП

встречается развитие специфических осложнений практически в половине всех случаев аутотрансплантации [Азолов В. В. и др., 2001; Дмитриев Д.Г., Ручин М. В., 2001; Алексеев А.А., 2014; Зиновьев Е.В., 2020].

Одним из таких специфических осложнений является лизис аутотрансплантата, частота встречаемости которого достигает трети всех проводимых САДП [Адо А.Д., 1980; Фисталь Э. Я., 2003; Sakaguchi S., 2013]. Лизис аутотрансплантата ведет не только к нарушению целостности уже закрытых дефектов от ожоговой травмы, а также потере аутотрансплантата как такового, но и к расширению площади поражения уже за счет донорских участков, откуда был взят перфорированный лоскут. Это ведет к неизбежному повтору уже проведенной САДП, либо к длительному консервативному лечению. Ведущей причиной неудач аутотрансплантации кожи является отсутствие объективных методов клиничко-лабораторной оценки готовности пациента к САДП.

Для отбора перфорированных лоскутов аутотрансплантатов с целью закрытия раневых участков существует ряд клиничко-патофизиологических признаков. С целью повышения вероятности благоприятного исхода необходимо отсутствие следующих характеристик: зон некроза, микрососудистых нарушений, геморрагий [Пивоварова Л. П. и др., 2005; Nusbaum, A.G., 2012]. Ведущей причиной отрицательных результатов лечения раневых участков после САДП является недостаточно полное изучение патологических процессов, происходящих при трансплантации кожи. Острой является проблема недостаточного использования возможностей современной лабораторной медицины в ЛПУ, занимающихся лечением пациентов с ожоговой травмой.

Отсутствие комплексных алгоритмов диагностики при выборе в том числе сроков проведения САДП диктует необходимость поиска лабораторных прогностических факторов для повышения вероятности благоприятных результатов у таких пациентов, как при терапии в целом, так и при САДП в частности.

Степень разработанности темы

Успех аутотрансплантации кожного лоскута во многом зависит от местного и системного иммунного ответа, который в свою очередь сопровождается нарушениями различных клиничко-лабораторных показателей. Лабораторными параметрами, которые используются в настоящее время в практике ведения пациентов с ожоговой травмой являются основные показатели общеклинического, биохимического анализов крови, а также показатели кислотно-основного состояния и газов крови [Жидовинов А.А. и др., 2006; Sennikov S.V. и др., 2002; Долгов, В. В., 2012; Khalil M.A., 2018].

Остается открытым вопрос о наиболее адекватных сроках проведения некрэктомии и возможности определения прогностических факторов успешного исхода ожоговой травмы. Было показано [Бемянский Н. В. и др., 2002; Зиновьев Е.В. и др., 2020], что ранняя некрэктомия наиболее целесообразна и минимизирует последующие риски распространения инфекционного процесса в ране.

Вторым наиболее важным моментом является проведение хирургического лечения пораженного участка кожи пациента. Занимающая 90% всех проводимых хирургических

операций по лечению ОТ, САДП является технически несложным и доступным методом, за счет чего он стал золотым стандартом хирургического лечения ОТ [McClain S.A., 1996; Wang H., Sui M., 2008; Зиновьев Е.В., 2020].

Однако, доля отрицательных исходов свободной аутодермопластики в виде отторжения аутооттрансплантата диктует необходимость уточнения как сроков, так и поиска оптимальных прогностических факторов готовности раны.

В исследованиях, посвященных непосредственно оценке иммунного ответа и репаративных способностей организма, особое значение уделяется восстановлению функций клеток иммунной системы, кератиноцитов, а также изучению представителей семейства матриксных металлопротеиназ (ММП) [Саркисов, Д.С., 1995; Соловьева Н.И., 1998; Szu-Yuan Li., 2014; Kobayashi T., 2014; Ponomarev A., 2019]. Ведущим процессом в вопросе восстановления кожи после аутодермопластики является репарация тканей. Представлены работы [Александрова А. В., 2012; Артемова Е.В. и др., 2016; Iyer K. et al., 2018] по изучению взаимосвязей функции кератиноцитов в ране и уровня металлопротеиназ, регулирующих активность восстановления как сосудистой сети, так и усиливающих процессы фиброзирование тканей.

В связи с вышеизложенным актуальность проведенного исследования состоит в установлении клиничко-лабораторных прогностических факторов исхода ожоговой травмы, которые отсутствуют на данный момент, и отбора наиболее значимых показателей для дальнейшего внедрения их в рутинную практику комбустиологических отделений.

Цель исследования – на основании клиничко-лабораторного обследования выявить прогностические факторы, которые определяют исход ожоговой травмы и риск отторжения аутооттрансплантата.

Задачи исследования

1. Изучить клиничческие данные, а также определить в динамике показатели общеклиничческого, биохимического анализов крови, показатели иммунологического профиля, ремоделирующей способности организма у пациентов с ожоговой травмой для оценки их значимости в отношении прогноза исхода ожоговой травмы.

2. Выделить наиболее значимые клиничко-лабораторные показатели для оценки состояния пациента с ожоговой травмой и готовности его к проведению аутодермопластики, а также определить их пороговые значения.

3. Изучить зависимость между иммунологическими параметрами, определяющими течение и исход ожоговой травмы, для оценки взаимодействия параметров врожденного и адаптивного иммунитета.

4. Используя современные методы статистики, на основании результатов лабораторных исследований создать модель для прогнозирования исхода операции свободной аутодермопластики.

Научная новизна работы

Впервые была проведена комплексная оценка воспалительного процесса, а также изучены показатели процессов ремоделирования тканей при аутооттрансплантации с использованием современных лабораторных методов у пострадавших с ожоговой травмой I-IIIАБ степени

тяжести. Всего изучено 94 клинико-лабораторных показателя, всесторонне характеризующих пострадавших с ожоговой травмой.

Впервые доказана возможность прогнозирования исхода САДП на основании результатов созданной искусственной нейронной сети, включающей оценку относительного содержания активированных Т-лимфоцитов $CD3^+HLA-DR^+$, концентрации интерлейкина 8 и матриксной металлопротеиназы 9.

Уточнена значимость параметров врожденного и адаптивного иммунитета в динамике развития ожоговой травмы, а именно субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, концентрация про- и противовоспалительных цитокинов, а также маркеров, участвующих в процессах ремоделирования тканей. Доказана диагностическая значимость определения иммунологических параметров как в отношении прогноза исхода ожоговой травмы, так и при прогнозе успешности проведения САДП.

Впервые изучена роль регуляторных Т-лимфоцитов, активационного рецептора NKG2D на НК-клетках и его лигандов в процессе развития ожоговой травмы. Доказана значимость регуляторных Т-лимфоцитов в отношении исхода ожоговой травмы, а также необходимость использования данного показателя в отношении прогноза летальности ожоговой травмы.

Впервые определены пороговые значения матриксной металлопротеиназы 9 в отношении прогноза исхода свободной аутодермопластики. Доказана значимость определения данного показателя накануне планируемого проведения свободной аутодермопластики.

Определены в динамике ожоговой травмы уровни как про-, так и противовоспалительных цитокинов, а также установлены пороговые значения всех показателей с определением наиболее прогностически значимых параметров.

Впервые проанализированы корреляционные связи между показателями клеточного и гуморального иммунного ответа в процессе преодоления последствий ожоговой травмы. Проведенный анализ корреляционных связей показал значимость взаимодействия параметров врожденного и адаптивного иммунитета, выраженный в прямой зависимости между количеством Т-регуляторных лимфоцитов и концентрациями интерлейкина 6, интерлейкина 8, TNF при поступлении пациента в стационар, а также между относительным содержанием активированных Т-лимфоцитов $CD3^+HLA DR^+$ и концентрациями интерлейкина 6, интерлейкина 8 накануне операции свободной аутодермопластики.

Теоретическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в том, что были охарактеризованы особенности иммунного ответа у пострадавших с ожоговой травмой, влияющие как на летальность пациентов, так и на приживление аутотрансплантата. В ходе проведения исследования охарактеризованы наиболее значимые звенья иммунопатогенеза ожоговой травмы. Установлено, что иммунопатогенез ОТ характеризуется дисбалансом не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета, о чем свидетельствуют изменения клинико-лабораторных показателей. Оценены связи между лабораторными показателями и степенью тяжести, площадью поражения и площадью трансплантируемого участка кожи у пострадавших с ожоговой травмой при различных исходах оперативного вмешательства.

Полученные результаты диссертационного исследования позволяют оптимизировать эффективность оперативного лечения, а также повысить качество проводимых мероприятий, направленных на подготовку пациента к САДП.

Практическая значимость работы

Практическая значимость диссертационного исследования заключается в расширении программы клинико-лабораторного обследования пациентов для повышения эффективности оперативного вмешательства. Создана модель прогнозирования исхода САДП посредством разработки нейронной сети, где в виде вводных данных служат клинико-лабораторные и иммунологические показатели. Единый подход к иммунодиагностике пострадавших с ожоговой травмой с определением наиболее значимых клинико-лабораторных показателей позволит оптимизировать схему терапии.

Показано, что у пострадавших с ожоговой травмой на основании определения иммунологических показателей возможно прогнозировать высокую вероятность наступления летального исхода с целью его предотвращения, а также точнее прогнозировать исход оперативного вмешательства при закрытии раневого дефекта. К таким показателям относятся содержание активированных Т-лимфоцитов $CD3^+HLA-DR^+$, концентрация интерлейкина 8 и матриксной металлопротеиназы 9 в отношении прогнозирования исхода оперативного вмешательства и относительное количество Т-регуляторных лимфоцитов, концентрация интерлейкина 6 в отношении прогнозирования летального исхода ожоговой травмы.

Внедрение диагностического алгоритма, включающего в себя определение указанных показателей в практику отдела клинической лабораторной диагностики и отделений комбустиологии и хирургии, является необходимым для объективизации и оценки течения ожоговой болезни, а также своевременного принятия решения при проведении САДП.

Материалы и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на научных трудах отечественных и зарубежных авторов в области изучения иммунопатогенеза ожоговой травмы. Для решения задач, поставленных перед исследованием, была проведена оценка клинических и лабораторных данных больных с ожоговой травмой.

В диссертационное исследование включено 64 пациента с ожоговой травмой I-ШАБ степени тяжести и 35 условно здоровых добровольцев. В комплекс исследований вошли изучение анамнестических данных, а также клинические, биохимические, иммунологические методы лабораторных исследований, статистический анализ. При статистической обработке результатов использовались пакеты Statistica 12.0 («StatSoft», США) с определением описательных статистик. Автоматизированные табличные расчеты, создание графиков и гистограмм проводились в программе Microsoft Excel 2016 для Windows.

Соответствие паспорту специальности

Тема работы, использованные методы и материалы, полученные результаты и их обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют паспортам специальностей 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика (пункты 2, 7, 8), 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (пункт 11).

Положения, выносимые на защиту

1. Расширение стандартного алгоритма обследования пациентов с ожоговой травмой за счет определения иммунологических показателей, к которым относится субпопуляционный состав лимфоцитов и цитокиновый профиль, позволяет повысить эффективность лабораторного обследования на всех этапах лечения.

2. Оценка содержания Т-регуляторных лимфоцитов и концентрации интерлейкина 6 при лабораторном обследовании пациентов с ожоговой травмой при поступлении в стационар необходима для определения группы пациентов с высокой вероятностью летального исхода с целью его предотвращения.

3. Определение содержания активированных Т-лимфоцитов, а также концентрации интерлейкина 8 и матриксной металлопротеиназы 9 у пациентов с ожоговой травмой перед проведением операции свободной аутодермопластики позволяет минимизировать риск отторжения аутотрансплантата.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обуславливается использованием современных, хорошо апробированных лабораторных методов исследования, а также корректным применением статистического анализа данных.

Основные результаты работы представлены в виде докладов и обсуждены в ходе Российских конференций: Многопрофильная клиника XXI века. Инновации в медицине, Санкт-Петербург (2018); Никифоровские чтения: передовые отечественные и зарубежные медицинские технологии, Санкт-Петербург (2018); Проблемы обеспечения безопасности при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций, Воронеж (2018); Многопрофильная клиника XXI века. Инновации в медицине, Санкт-Петербург (2019); Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины, Санкт-Петербург (2019); IX Международный научный конгресс Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт, Санкт-Петербург (2020); Интегративная пластическая хирургия в многопрофильном медицинском центре МЧС России, Санкт-Петербург (2021).

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выполнении всех этапов диссертационного исследования. Планирование научной работы, постановка цели и задач диссертационного исследования проводилось совместно с научными руководителями. Научно-информационный поиск, анализ данных научной литературы выполнены лично автором. Набор исследуемого материала, анализ и интерпретация полученных данных, статистическая обработка результатов, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, выполнены лично соискателем под руководством научных руководителей. Лабораторные исследования выполнены автором лично и при участии сотрудников отдела лабораторной диагностики ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова МЧС России.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты исследования внедрены в практическую работу отдела клинической лабораторной диагностики, ожогового отделения с пластической хирургией и образовательный

процесс кафедры терапии и интегративной медицины ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, а также отдела термических поражений ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертационного исследования опубликовано 11 печатных работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 189 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, а также выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 48 таблицами и 79 рисунками. Список литературы включает 163 источника, из которых 51 отечественных и 112 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационное исследование выполнено на базе отдела лабораторной диагностики и одобрено этическим комитетом ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. Основными клиническими базами настоящего исследования явились ожоговое отделение с пластической хирургией ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России и отдел термических поражений СПб НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. Лабораторные иммунологические исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии отдела лабораторной диагностики ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России.

В диссертационное исследование было включено 99 человек. Критериями включения в группу обследованных пациентов (n=64) с ОТ стали: возраст от 18 до 65 лет, наличие ОТ I - ШАБ степени тяжести, наличие глубоких ожогов кожи на площади не менее 1% поверхности тела, показание к оперативному восстановлению кожного покрова методом свободной аутодермопластики. Критерии исключения пациентов из группы обследованных: наличие онкологических заболеваний, тяжелых иммунодефицитных состояний в анамнезе, заболеваний с поражением кожных покровов.

Группу сравнения (n=35) составили условно-здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет, критерии исключения были аналогичны таковым в основной группе.

Основная группа пациентов с ОТ (n=64) состояла из 41 мужчины и 23 женщин, средний возраст мужчин составил $45,7 \pm 10,7$ лет (Mean \pm SD), женщин $48 \pm 11,6$ лет (Mean \pm SD). В посттравматическом периоде часть пациентов скончалась от последствий ОТ (n=11), вследствие чего обследование им проводилось только после наступления ожоговой травмы, они сформировали отдельную группу.

Пациентам проводили забор периферической крови (ПК) из локтевой вены в динамике 3 раза: 1 исследование – 1-е сутки после получения ожоговой травмы, 2 исследование – сутки

накануне оперативного вмешательства САДП ($19 \pm 11,3$ дней от получения травмы, от 2-47 суток), 3 исследование соответствовало первой перевязке (4-6 сутки после САДП, $24 \pm 12,1$ дней от получения травмы, от 7-54 суток), при которой происходила оценка приживления кожного аутотрансплантата. Общий перечень выполненных исследований всем пациентам, а также группе сравнения представлен в таблице 1.

Таблица 1. Перечень выполненных лабораторных исследований в различные сроки после ОТ

Вид исследований	Группа сравнения (n=35)	Пациенты с ОТ (n=64) в динамике			Всего
		1	2	3	
Общеклинические исследования (11 показателей)	385	704	583	583	2255
Биохимические исследования (8 показателей)	280	512	424	424	1640
Проточная цитометрия (39 показателей)	1365	2496	2067	2067	7995
Иммуноферментный анализ (9 показателей)	315	576	477	477	1845
Всего исследований	2345	4288	3551	3551	13735

Во 2-м и 3-м динамическом обследовании не участвовала группа пациентов с летальным исходом ($n=11$), так как они погибли на $4,3 \pm 1,1$ сутки.

Общеклинические исследования

Для получения общего представления о состоянии пациентов после получения ОТ во всех точках обследования было проведено общеклиническое исследование крови. Исследование выполняли на образцах цельной крови, забранной из локтевой вены натощак в утренние часы в вакутейнеры с K_2 ЭДТА. Все пробы периферической крови доставляли в лабораторию с соблюдением температурного режима ($2-8^\circ\text{C}$) и подвергали исследованию не позже 2 часов после взятия. Использовали референтные значения, представленные в Национальном руководстве по клинической лабораторной диагностике [Долгов, В. В., 2012].

Биохимические исследования

Результаты биохимических исследований позволяют не только яснее представить состояние организма при ОТ, но и проследить динамику развития патологии с учетом проведения САДП. В связи с этим был оценен ряд биохимических показателей.

В качестве биологического материала использовали сыворотку периферической крови, забранной из локтевой вены натощак в утренние часы в вакутейнеры с активатором свертывания. Все пробы доставляли в лабораторию с соблюдением температурного режима ($2-8^\circ\text{C}$). Методом центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут отделяли сыворотку от клеточных элементов. Анализ проводили с использованием автоматического биохимического анализатора Architect c8000 (Abbott Laboratories, США).

Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитометрии (Navios, Beckman Coulter, США) в многопараметрическом анализе по безотмывочной технологии проводили исследование параметров клеточного иммунитета на образцах цельной крови, забранной из локтевой вены натощак в утренние часы в вакутейнеры с K_2 ЭДТА. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы

Navios Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software. Для лизиса эритроцитов при оценке субпопуляционного состава лимфоцитов, субпопуляций NK-клеток, экспрессии активирующего рецептора NKG2D, применяли лизирующий раствор VersaLyse (Beckman Coulter, США), использовали Fixative Solution (Beckman Coulter, США) в качестве фиксирующего компонента. Методика оценки субпопуляционного состава лимфоцитов включала использование широкой панели моноклональных антител (Beckman Coulter, США). В работе оценивали соотношение В-, Т-, НКТ-, НК лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD25) на популяциях клеток-эффекторов иммунного ответа.

Референтные интервалы для всех исследованных популяций лимфоцитов, а также для показателей, характеризующих плотность экспрессии активирующего рецептора NKG2D, были определены в ходе выполнения диссертационной работы при иммунологическом обследовании условно здоровых людей (n=35). Показатели были рассчитаны, исходя из определения нижнего квартиля Q25 и верхнего квартиля Q75.

Иммуноферментный анализ

Изучение цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF, TGF- β), лигандов активирующего рецептора NKG2D – (ULBP-1 и MICB), а также матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) проводили методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реактивов «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» «Вектор Бест» (Россия), «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ» «Вектор Бест» (Россия), «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» «Вектор Бест» (Россия), «альфа-TNF-ИФА-БЕСТ» «Вектор Бест» (Россия), «Human TGF- β 1 Platinum ELISA» Thermo Fisher Scientific (США), «Human ULBP-1 ELISA Kit» RayBiotech (США), «Human MICB ELISA Kit» RayBiotech (США), «Human MMP9 ELISA Kit» R&D Systems (США) предназначенных для количественного определения содержания аналитов в сыворотке крови.

Методы статистической обработки полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Statistica 12.0 («StatSoft», США) с определением описательных статистик (средних значений, медианы, стандартной ошибки, нижнего и верхнего квартилей). Статистическую значимость различий в группах оценивали при помощи непараметрического теста U - Манна-Уитни с применением методов визуализации таблиц и гистограмм. Для проведения автоматизированных табличных расчетов, подготовки графиков и диаграмм использовали программу Microsoft Excel 2016 для Windows. Статистически значимыми различия сравниваемых показателей считали при $p < 0,05$. Для определения порогового значения (cut-off point) применяли ROC-анализ (построение Receiver Operator Characteristic curve) с определением индекса Юдена (Youden index J). Диагностическую эффективность показателя оценивали путем определения площади под ROC кривой (AUC или Area Under Curve).

При создании диагностической модели прогноза исхода САДП была разработана искусственная нейронная сеть (ИНС) с функцией самообучения модуля «Neural Networks» пакета Statistica 12.0 («StatSoft», США). В рамках исследования использовали одну из простых архитектур ИНС в виде персептрона. Обучение персептрона и выбор наилучшей модели проводился при достижении процента правильно спрогнозированных случаев на всех трех слоях

(обучающий, тестовый, валидационный) выше 80%. В качестве выходных показателей в модели оставляли только те показатели, оценка информативности (Sensitivity analysis) которых была выше 1,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходы ожоговой травмы оценивали по числу летальных случаев, а оперативного вмешательства - по наличию полного приживления аутотрансплантата или частичного лизиса пересаженного кожного лоскута.

Общая характеристика исследованных групп

Значимых возрастных различий между группами пациентов и в сформированной группе сравнения обнаружено не было (табл.2). Среди пациентов с ОТ преобладали мужчины (41 мужчина и 23 женщины), что совпадает с данными литературы о том, что мужчины страдают от ОТ чаще женщин.

Таблица 2. – Распределение пациентов с ОТ по полу и возрасту, исходу ОТ, Mean±SD

Показатели	Количество пострадавших с ОТ (n=64)			
	Мужчины		Женщины	
	n (%)	Возраст, годы	n (%)	Возраст, годы
Выжившие после ОТ (n=53)	34 (64%)	43,3±11,0	19 (36%)	49,9±10,4
Пациенты с летальным исходом ОТ (n=11)	7 (64%)	51,7±6,1	4 (36%)	38,5±13,7
Всего:	41 (64%)	44,8±10,7	23 (36%)	47,9±11,6
Возраст, годы	44,4±11,0			

При оценке этиологических факторов ведущим стала ОТ, полученная от воздействия пламенем (79,6%), горячей водой и паром (7,8%). В остальных случаях причиной ОТ было электричество и контактный факторы (6,2%). Статистические данные последних лет в РФ говорят о том, что одним из ведущих этиологических факторов повреждения при ОТ является пламя [Пономарева Н.А. и др., 2009; Чеснокова Н.П. и др., 2011].

Нами была проанализирована локализация поражений. Выявлено, что чаще всего при ОТ поражались туловище и конечности (82,2%), голова была поражена в 64% случаев. Практически у половины пострадавших (45,3%) отмечались комбинированные по локализации поражения, включающие в себя как голову, конечности, так и туловище.

При анализе клинических данных, таких как пол, возраст, были проанализированы и прогностические индексы Франка и Бо. Прогностические индексы в группе выживших составили 63,1±37,3 и 73,7±20,2, а в группе с летальным исходом 105,5±47,1 и 90,9±24,9 соответственно. Различия по обоим индексам в этих двух группах были статистически значимы. Это соотносится с данными литературы о том, что прогноз при показателях индексов выше 90 у.е. по Франку – неблагоприятный, а выше 80 у.е. по Бо – сомнительный [Dokter J. et al., 2014]. При описании клиничко-лабораторных показателей многими авторами отмечается дисбаланс всех звеньев иммунной системы при ОТ [Медников Р.В., 2002; Kravitz, M., 1993; Zhylnskiy E.V., 2015]. При оценке общеклинических показателей крови чаще всего на начальных этапах после ОТ, когда отмечается распад мягких тканей, характеризующийся активацией воспалительных реакций в

местах ожога, наблюдается абсолютная и относительная лимфопения, нейтрофилез [Shalom, A., 2011; Khalil M.A. et al., 2018]. В нашем исследовании среди показателей клинического анализа крови найдены значимо различающиеся параметры в группах выживших и пациентов с летальным исходом, а именно лейкоцитоз, абсолютная и относительная лимфопения, абсолютный и относительный нейтрофилез (табл.3).

Таблица 3. Результаты клинического анализа крови по группам при получении ожоговой травмы, Mean±SD

Показатель	Референтные значения	Группа сравнения (n=35)	Выжившие пациенты (n=53)	Пациенты с летальным исходом (n=11)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4-9	5,6±1,1	15,1±6,6*	25,3±8,5 ^{*,**}
Лимфоциты (абс.), 10 ⁹ /л	1,2-3	1,6±0,3	1,4±0,8*	1,0±0,6*
Лимфоциты (отн.), %	19-37	30,4±4,3	11,8±8,1*	4,4±2,7 ^{*,**}
Гранулоциты (отн.), %	1-6	3,3±0,8	12,4±6,2*	22,5±8,0 ^{*,**}
Гранулоциты (абс.), 10 ⁹ /л	41-72	59,5±6,4	79,9±9,6*	88,6±2,7 ^{*,**}

Примечание. * - p<0,05 по отношению к группе сравнения, ** - p<0,05 при сравнении групп пациентов

Результаты биохимического анализа крови подтверждали тяжесть состояния пациентов с летальным исходом в будущем, что выразилось в существенном дисбалансе всех измеренных показателей (табл.4).

Таблица 4. Результаты биохимического анализа крови по группам, Mean±SD

Показатель	Референтные значения	Группа сравнения (n=35)	Выжившие пациенты (n=53)	Пациенты с летальным исходом (n=11)
АЛТ, Ед/л	5-40	18,6±5,1	44,4±39,6 ^{*,**}	97,1±53,2
АСТ, Ед/л	5-40	18,8±6,1	60,3±61,6 ^{*,**}	168,7±97,2
Общий белок, г/л	65-85	71,5±3,1	64,2±11,3 ^{*,**}	54,7±9,0
Глюкоза, ммоль/л	3,3-5,5	4,7±0,7	7,1±1,5*	8,7±2,5*
КФК, Ед/л	0-171	47,9±33,6	606,7±769,1*	1580,8±2237,9

Примечание. * - p<0,05 по отношению к группе сравнения, ** - p<0,05 при сравнении групп пациентов

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов, NK-клеток при ожоговой травме описывается в литературе [Schneider D.F. et al., 2007; Zingoni A., 2018]. Выраженные различия между группами с разным исходом травмы при оценке субпопуляционного состава методом проточной цитофлуориметрии отмечены для ряда показателей. У пациентов с летальным исходом выявлено выраженное увеличение относительного количества Т-лимфоцитов CD3⁺, NKT-клеток CD3⁺CD(16⁺56⁺)⁺, Т-цитотоксических CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, а также снижение абсолютных показателей CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов. Выраженность активации, в том числе увеличение Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR, соответствовало тяжести ОТ, этот показатель был в два раза выше в группе с летальным исходом по сравнению с выжившими пациентами.

В литературе нами не было найдено аналогичных данных о роли активированных Т-лимфоцитов при ожоговой травме (табл. 5).

Ряд авторов при анализе летальности ОТ рассматривают повышенное количество Т-регуляторных лимфоцитов как показатель неблагоприятного прогноза [Huang L. et al., 2010; Laura C. et al., 2020], что совпадает с нашими данными.

Таблица 5. - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов пациентов при получении ожоговой травмы, Mean±SD

Показатель	Референтные значения	Группа сравнения (n=35)	Выжившие пациенты (n=53)	Пациенты с летальным исходом (n=11)
CD3 ⁺ (Т-лимфоциты), %	67-82	76,4±4,0	77,3±5,0 ^{**}	84,9±3,18 [*]
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (NKT-клетки), %	1,5-8,0	3,5±1,8	6,1±3,6 ^{*,**}	10,5±4,03 [*]
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Т-хелперы), x10 ⁹ /л	0,63-1,11	0,8±0,2	0,7±0,4 ^{*,**}	0,5±0,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (Т-цитотоксические), %	21-34	25,0±5,2	28,6±3,6 ^{*,**}	38,2±3,8 [*]
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (акт. Т-клетки), %	1-10	7,9±4,0	12,8±6,1 ^{*,**}	23,8±9,6 [*]

Примечание. * - p<0,05 по отношению к группе сравнения, ** - p<0,05 при сравнении групп пациентов

Относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов в группе с летальным исходом было в 1,5 раза выше, чем в группе выживших пострадавших, при этом в обеих группах показатель отличался от группы сравнения, превышая верхнюю границу референтного интервала (табл.6).

Таблица 6. Регуляторные Т-лимфоциты пациентов в зависимости от исхода ОТ при получении ожоговой травмы, Mean±SD

Показатель	Референтные значения	Группа сравнения (n=35)	Выжившие пациенты (n=53)	Пациенты с летальным исходом (n=11)
Регуляторные Т-клетки CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{neg} , %	1,65-5,75	4,7±1,1	9,5±2,4 [*]	14,2±1,1 ^{*,**}

Примечание. * - p<0,05 между группами пострадавших: ** - p<0,05 с группой сравнения

В литературе обсуждается роль цитокинов, как про-, так и противовоспалительных в процессе развития ОТ. Определение ряда цитокинов, в частности IL-6, IL-8, TNF важно в прогнозе летальности при сепсисе и при ОТ, в частности [Remick D.G. et al., 2005; Chaudhry H. et al., 2013; Moore-Smith, L.D. et al., 2017].

При анализе результатов лабораторных показателей в группах пациентов при поступлении в стационар выявлено, что обе обследованные нами группы пострадавших имели повышенные показатели всех изученных цитокинов в сыворотке крови, кроме TGFβ. Увеличение концентрации цитокинов в группе с летальным исходом по сравнению с группой выживших было значительно более выражено – для IL-6 – в 8,3 раза, IL-8 – в 4,2 раза, IL-10 – в 6,9 раз, TNF – в два раза, что свидетельствовало о более выраженном воспалительном ответе у пациентов с неблагоприятным исходом ОТ (табл.7).

Таблица 7. Уровни про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов при получении ожоговой травмы, Ме [Q25;Q75]

Показатель	Референтные значения	Группа сравнения (n=35)	Выжившие пациенты (n=53)	Пациенты с летальным исходом (n=11)
IL-6, пг/мл	0-10	5,7 [4,4;7,3]	136,9 ^{***} [46,0;227,0]	1137,0 ^{***} [590,0;1449,0]
IL-8, пг/мл	0-10	6,2 [4,9;7,5]	70,1 ^{***} [15,0;99,0]	295,4 ^{***} [260,0;350,0]
IL-10, пг/мл	0-31	19,8 [17,5;23,1]	37,3 ^{**} [14,1;45,0]	257,7 ^{**} [154,0;260,0]
TNF, пг/мл	0-6	3,2 [1,0;4,9]	27,8 ^{***} [17,9;35,1]	56,4 ^{***} [35,0;63,1]
TGF- β , пг/мл	700-986	789,3 [700,4;986,0]	727,1 [673,8;790,0]	685,4 [591,0;867,5]

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к группе сравнения, ** - $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов

Определение наиболее значимых прогностических показателей в отношении летальности как исхода ОТ

Методом логистической регрессии определен перечень показателей, наиболее значимых для прогнозирования исхода ОТ, пороговые значения которых были впоследствии определены методом ROC-анализа. В отношении прогноза летальности наиболее важными показателями при получении ожоговой травмы стали следующие параметры, превышение значений которых являлось неблагоприятным признаком при прогнозе исхода ОТ, а именно: индекс Франка – пороговое значение 75,7 у.е., уровень лейкоцитов – $19,0 \cdot 10^9/\text{л}$, концентрация АСТ – 68,7 ед/л, относительное содержание Т-клеток 83,5 %, Т-цитотоксических лимфоцитов - 53,1 %, НКТ-клеток - 7,3 %, регуляторных Т-клеток – 12,1 %, плотность экспрессии NKG2D на CD8^+ - 1,47, плотность экспрессии NKG2D на НКТ-клетках – 5,1, концентрации цитокинов IL-6 – 460,0 пг/мл, TNF – 31,5 пг/мл.

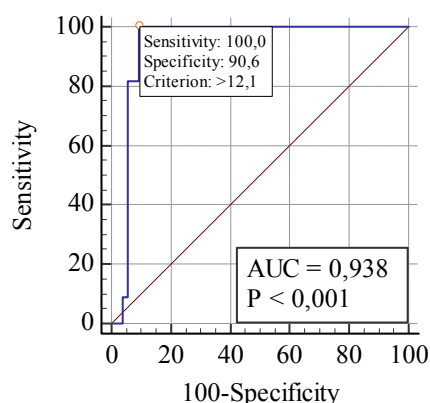


Рисунок 1. – ROC-кривая относительного количества регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов в группах выживших и с летальным исходом

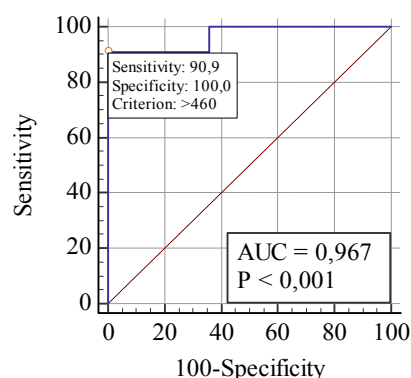


Рисунок 2. – ROC-кривая концентрации IL-6 в группах выживших и с летальным исходом

Наибольшей прогностической мощностью, не ниже 85% чувствительности и специфичности, обладали показатели относительного количества Т-регуляторных лимфоцитов (100,0%, 90,6%) (рис.1) и концентрация в сыворотке IL-6 (90,9%, 100,0%) (рис.2).

Полученные пороговые величины важны для прогнозирования неблагоприятного исхода ОТ с целью назначения своевременной терапии, результатом которой будет являться снижение риска летального исхода в послеожоговый период.

Характеристика групп пациентов в зависимости от исхода операции свободной аутодермопластики

В соответствии с целью нашего исследования, а именно поиском значимых клинико-лабораторных показателей, влияющих на исход САДП, накануне операции у 53 выживших пострадавших был оценен повторно весь перечень клинико-лабораторных показателей.

Выжившие пострадавшие были разделены на группы в зависимости от исхода САДП – полное приживление (n=25), частичный лизис (n=28) (табл.8).

Таблица 8. Общая характеристика пациентов с ОТ накануне САДП в зависимости от исхода операции, Mean±SD

Показатели	Выжившие пациенты с ОТ (n=53)			
	Группа с полным приживлением аутотрансплантата (n=25)		Группа с частичным лизисом аутотрансплантата (n=28)	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
Пол, %	18 (72%)	7 (28%)	16 (57,1%)	12 (42,9%)
Возраст, в годах	44,0±11,2	45,0±12,0	46,0±11,0	47,0±11,0
Возраст, в годах	46,0±11,0			

Оценка распределения по гендерному признаку в группах показала, что группа с полным приживлением состоит из 18 мужчин (72%) и 7 женщин (28%), а в группе с частичным лизисом было 16 мужчин (57,1%) и 12 женщин (42,9%). Средний возраст всех прооперированных составил 46,0±11,0 лет.

Прогностические индексы Франка и Бо применяются для оценки выживаемости на ранних этапах после получения ОТ [Dokter J. et al., 2014]. Но в нашем исследовании при оценке этих показателей индекс Франка показал статистически значимые различия между группами с полным приживлением и частичным лизисом и был значимо ниже у пациентов с благоприятным течением послеоперационного периода - 44,9±20,9 у.е. по сравнению с другой группой - 75,0±36,1 у.е. (p=0,001). Для уточнения влияния индекса Франка на исход САДП, был проведен ROC-анализ, определено пороговое значение в 81 у.е., показатели чувствительности теста оказались 100%, при невысокой специфичности 50%. Индекс Бо между двумя группами значимо не различался.

Проанализированные данные о площади САДП свидетельствовали о том, что в группе с полным приживлением средняя площадь оперативного вмешательства была почти в 2 раза меньше, чем в другой группе (3,0±2,2 % и 5,6±3,2 %, p=0,003). Для уточнения влияния площади на исход оперативного вмешательства был проведен ROC-анализ, определена точка cut-off в 5% для значения площади. Тест показал невысокую чувствительность в 46% при 88% специфичности, уровень значимости был высоким (p=0,0006). Таким образом, можно утверждать, что площадь проводимой операции САДП влияет лишь опосредованно на конечный результат, и не является одним из определяющих характеристик исхода приживления. Однако,

выявленный порог, не превышающий 5 % площади тела, является рекомендуемым ориентиром размеров одномоментно пересаживаемого лоскута.

При оценке параметров клинического анализа крови накануне САДП, в обеих группах наблюдалось снижение количества эритроцитов и гемоглобина. В группе пациентов, у которых в дальнейшем отмечался частичный лизис трансплантата, дополнительно был выявлен лейкоцитоз с относительной лимфопенией и абсолютным нейтрофилезом (табл.9).

При оценке динамики показателей от момента поступления до момента САДП отмечалась положительная динамика в обеих группах по снижению лейкоцитоза, повышению относительного и абсолютного содержания лимфоцитов, снижению относительного и абсолютного содержания гранулоцитов.

Однако, если в группе с полным приживлением эти процессы шли достаточно быстро и накануне САДП почти все показатели клинического анализа крови были в пределах референтного интервала, то в группе с частичным лизисом многие показатели оставались измененными.

Таблица 9. Результаты клинического анализа крови по группам пациентов накануне САДП, Mean±SD

Показатель	Референтные значения	Группа с полным приживлением аутотрансплантата (n=25)	Группа с частичным лизисом аутотрансплантата (n=28)
Лейкоциты, 10^9 /л	4-9	9,1±3,3*	11,4±2,1*
Лимфоциты (абс.), 10^9 /л	1,2-3	2,0±0,6	1,4±0,4
Лимфоциты (отн.), %	19-37	24,8±9,6	12,8±3,8*
Гранулоциты (отн.), %	1-6	5,9±3,1	7,8±2,3*

Примечание. * - $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов

Таким образом, мы обнаружили значимые различия практически по всем основным показателями крови в группах с различным исходом САДП.

С помощью ROC-анализа определены пороговые значения содержания клеток крови с целью прогнозирования исхода операции. Неблагоприятный исход более вероятен при количестве лейкоцитов более $8,7 \times 10^9$ /л ($p < 0,001$, чувствительность 92,86 %, специфичность 64,0 %), относительном количестве лимфоцитов менее 16,1 % ($p < 0,001$, чувствительность 92,8%, специфичность 80,0%).

Таким образом, уточнены наиболее значимые для исхода САДП показатели клинического анализа крови, а также определены их пороговые значения для более верного принятия решения в отношении проведения САДП.

Динамика биохимических показателей в группах с различным исходом от момента получения ожоговой травмы до проведения САДП была положительной в обеих группах, большинство показателей накануне САДП в обеих группах приближались к референтным значениям, при этом не происходило снижения концентрации глюкозы и наблюдалось дальнейшее уменьшение общего белка (табл.10). Можно провести параллели с данными литературы [Demling R.H. et al., 1984; Khalil M. et al., 2018] в отношении летальности, где также

фиксируются данные о гипопропротеинемии, как о неблагоприятном факторе исхода ОТ.

Таблица 10. Результаты биохимического анализа крови по группам накануне САДП, Mean±SD

Показатель	Референтные значения	Группа с полным приживлением аутотрансплантата (n=25)	Группа с частичным лизисом аутотрансплантата (n=28)
АЛТ, ед/л	5-40	28,2±10,3	33,2±20,0
АСТ, ед/л	5-40	28,1±9,9	34,5±15,4
Белок общий, г/л	65-85	62,1±6,9*	55,7±7,0*
Глюкоза, мкмоль/л	3,3-5,5	4,8±1,0*	6,2±1,7*

Примечание. * - $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов

На сегодняшний день в источниках литературы существуют данные о роли и динамике показателей субпопуляционного состава лимфоцитов после получения ОТ [Entezami K.Z. et al., 2017]. Результаты многих авторов варьируют, некоторые отмечают в первые периоды после ОТ существенное снижение всех основных показателей субпопуляционного состава, другие отмечают, наоборот, эскалацию как относительного, так и абсолютного содержания Т-, В-, НК-лимфоцитов в ответ на ожог [Schneider D.F. et al., 2007; Meenakshi R., 2017]. Более того, работ, посвященных готовности раны к САДП, а также роли вышеописанных показателей на исход оперативного вмешательства, в литературе единицы.

Нами оценена динамика показателей субпопуляционного состава лимфоцитов от момента поступления до дня накануне САДП (табл 11). Практически все параметры в обеих группах как по относительному содержанию, так и по абсолютным показателям вернулись в пределы референтного интервала. Между группами с различным исходом САДП была обнаружена невыраженная, хотя и статистически значимая разница по содержанию Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток, но различия не влияли на исход САДП, что было продемонстрировано методом логистической регрессии.

Многими авторами отмечается [Venet F. et al., 2007; Zwadlo-Klarwasser G. et al., 1996; Zingoni A., 2018; Naik J., 2016] влияние на исход ожоговой травмы не только количественных изменений содержания тех или иных субпопуляций лимфоцитов, но и степень активации клеток. Чаще всего упоминается активационный маркер HLA-DR, и его экспрессия на Т-лимфоцитах. Однако, как было отмечено выше, все эти данные в основном сводятся к обсуждению влияния этих показателей на выживаемость скорее, чем на успех САДП.

Обращает на себя внимание значительное повышение относительного и абсолютного содержания активированных Т-клеток CD3⁺HLA-DR⁺ в группе с частичным лизисом по сравнению с пациентами из группы с полным приживлением.

Динамика абсолютного и относительного содержания активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA-DR⁺ при получении ожоговой травмы и накануне САДП в группах была противоположной. В группе пациентов с полным приживлением аутотрансплантата наблюдалось снижение количества активированных Т-лимфоцитов до нормальных значений, а в другой группе происходил дальнейший рост активации.

Таблица 11. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов пациентов накануне САДП в зависимости от исхода операции, Mean±SD

Показатель	Референт-ные значения	Группа с полным приживлением аутотрансплантата (n=25)	Группа с частичным лизисом аутотрансплантата (n=28)
CD3 ⁺ (Т-лимфоциты), %	67-82	75,4±3,8*	79,2±6,3
CD3 ⁺ (Т-лимфоциты), x10 ⁹ /л	1,1-1,9	1,5±0,5*	1,1±0,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Т-хелперы), x10 ⁹ /л	0,63-1,11	0,9±0,2*	0,7±0,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (Т-цитотоксические), x10 ⁹ /л	0,3-0,7	0,6±0,2*	0,4±0,1
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ активированные Т-клетки), %	1-10	9,8±0,8*	18,6±6,3

Примечание. * - p<0,05 при сравнении групп пациентов

Методом ROC-анализа было определено пороговое значение относительного содержания CD3⁺HLA-DR⁺ - 11,1 %, выше которого более вероятен неблагоприятный исход операции (p<0,0001, чувствительность 96,43%, специфичность 100%) (рис.3).

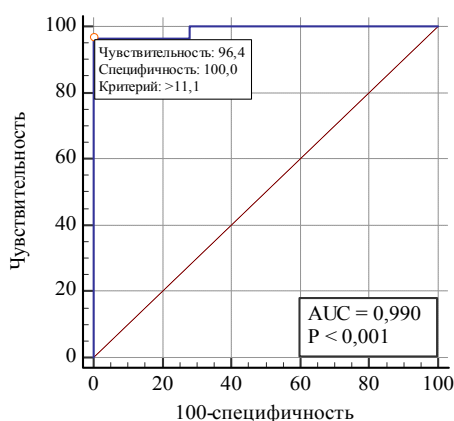


Рисунок 3. ROC-кривая влияния относительного количества CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов накануне САДП на исход операции

Таким образом можно говорить о том, что среди всех показателей субпопуляционного состава лимфоцитов именно уровень активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA-DR⁺ имеет наиболее важное значение.

Говоря о системном воспалении, необходимо учитывать влияние цитокинов на процессы заживления ожоговой раны. Влияние про- и противовоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, TNF, TGF-β) на течение и исход ОТ значимо, но большее количество работ посвящено определению цитокинов для прогноза выживаемости ожоговых пациентов в отличие от исследований влияния цитокинов на исход САДП [Wang H., 2007; Remick D.G., 2005; Pileri D., 2008]. Увеличивается количество сообщений о роли TGF-β, а именно TGFβ-1, в процессе заживления ран и его участие в процессах ремоделирования [Paquari M. et al., 2013]. Концентрации всех цитокинов значимо различались в группах с различным исходом САДП. Отмечалось превышение содержания в сыворотке провоспалительных цитокинов в группе с частичным лизисом аутотрансплантата при всех сроках наблюдения. Однако, уровни противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGFβ в

этой группе значимо ниже, чем в группе с полным приживлением. Это указывает на то, что соотношение про- и противовоспалительных цитокинов в группе с частичным лизисом выше, чем в другой группе, что вносит вклад в неблагоприятный исход САДП (табл. 12).

Таблица 12. Концентрация про- и противовоспалительных цитокинов накануне САДП в группах с различным исходом, Ме [Q25;Q75]

Показатель	Референтные значения	Группа с полным приживлением аутотрансплантата (n=25)	Группа с частичным лизисом аутотрансплантата (n=28)
IL-6, пг/мл	0-10	19,0* [10,1±28,5]	91,3 [79,6±96,5]
IL-8, пг/мл	0-10	38,0* [25,6±59,0]	69,2 [51,0±98,6]
IL-10, пг/мл	0-31	6,6* [4,6±10,0]	5,0 [3,9±8,1]
TNF, пг/мл	0-6	13,6* [11,1±19,6]	20,9 [16,1±28,8]
TGFβ, пг/мл	700-986	1240,0* [980,0±1450,0]	877,5 [986,6±967,0]

Примечание. * - $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов

В динамике наблюдалось значимое снижение в обеих группах концентрации IL-6, а также концентрации TNF у пациентов с частичным лизисом.

При ожоговой травме в процессе заживления раны непрерывно происходит процесс ремоделирования поврежденной ткани. В литературе наиболее часто при этом процессе в качестве регуляторов интенсивности и успешности заживления упоминается представитель семейства матриксных металлопротеиназ – MMP-9 [Corbel M. et al., 2000; Iyer R.P., 2012; Kobayashi T., 2014]. Обсуждается неоднозначное влияние MMP-9 на исход САДП.

Анализируя динамику изменения концентрации MMP-9, в нашем исследовании было выявлено двукратное снижение содержания MMP-9 от момента получения травмы до дня накануне операции в группе с полным приживлением (табл. 13).

В группе с неблагоприятным исходом САДП снижение концентрации MMP-9 было незначительным. Это указывает на то, что высокие уровни MMP-9 являются неблагоприятным фактором, влияющим на исход САДП.

Таблица 13. Концентрация MMP-9 в сыворотке крови пациентов накануне САДП, Mean±SD

Показатель	Группа с полным приживлением аутотрансплантата (n=25)	Группа с частичным лизисом аутотрансплантата (n=28)
MMP-9, нг/мл	29,3±5,4*	58,3±30,8*

Примечание. * - $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов

Многие авторы указывают на регуляцию активности MMP-9 цитокинами, в частности TGFβ [Kobayashi T. et al., 2014]. При оценке тесноты и силы связи по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена обнаружена статистически значимая обратная средней силы связь концентраций TGFβ и MMP-9 накануне САДП ($R_s = -0,561$; $p = 0,00001$).

Суммируя данные о MMP-9 и TGFβ, мы получили сопоставимые результаты с данными других авторов [Kobayashi T. et al., 2014; Moore-Smith L.D. et al., 2017]. Полученные нами пороговые значения по каждому показателю позволяют использовать их для прогнозирования исхода аутотрансплантации, а также дополняют представление о динамике данных молекул,

принимающих участие в процессах ремоделирования тканей.

Для прогнозирования успешности САДП мы проанализировали полученные клиничко-лабораторные показатели накануне операции. Среди 70 параметров, 68 из которых являлись лабораторными, были выделены 33 статистически значимых показателя, различающихся в группах с благоприятным и неблагоприятным исходами САДП. Была проведена сортировка этих показателей методом логистической регрессии, в результате были выделены наиболее значимые клиничко-лабораторные показатели с учетом их влияния на конечный результат в виде полного приживления аутотрансплантата.

Таким образом, накануне операции в отношении благоприятного прогноза исхода САДП значимыми показателями были абсолютное количество лейкоцитов (менее $8,7 \times 10^9/\text{л}$), лимфоцитов (более $1,6 \times 10^9/\text{л}$), нейтрофилов (менее $5,3 \times 10^9/\text{л}$), $\text{CD}19^+$ В-лимфоцитов (более $0,13 \times 10^9/\text{л}$), относительное количество лимфоцитов (более 16 %), активированных Т-лимфоцитов $\text{CD}3^+\text{HLA-DR}^+$ (менее 11,1 %), Т-цитотоксических клеток, экспрессирующих NKG2D рецептор $\text{NKG}2\text{D}^+\text{CD}8^+$ (более 98,2 %), плотность экспрессии $\text{CD}56$ на цитокинпродуцирующей популяции НК-клеток $\text{CD}56^+\text{CD}16^-$ (менее 7,4 у.е.), концентрация IL-8 (менее 46 пг/мл), TNF (менее 15,3 пг/мл) и MMP-9 (менее 41 нг/мл).

Построение искусственной нейронной сети на основе наиболее значимых клиничко-лабораторных показателей

На основании определенных наиболее значимых показателей методом логистической регрессии была построена ИНС (искусственная нейронная сеть), задача которой заключалась в прогнозировании исхода САДП.

Внутри нейронной сети были исключены наименее значимые показатели среди представленных выше и оставлены параметры, наиболее влияющие на результат-отклик. Была построена ИНС с мощностью на тренировочной выборке 96%, на тестовой выборке 100% и на контрольной выборке 93,3%. В полностью сформированную нейросеть вошли 3 показателя из 10 - относительное содержание $\text{CD}3^+\text{HLA-DR}^+$, концентрация в сыворотке IL-8 и MMP-9 (табл. 14).

Таблица 14. Оценка влияния признаков входного вектора на принятие решения искусственной нейронной сетью

ИНС	Признак		
	$\text{CD}3^+\text{HLA-DR}^+$, %	IL-8, пг/мл	MMP-9, пг/мл
RBF 3-8-1	2,45	1,27	1,6

Весовые коэффициенты показателей превышали значение 1,0 по модулю, что указывало на их значимость по отношению к отклику. Показатели чувствительности выбранной модели составили 98,5%, специфичности 88%.

Таким образом, была достигнута цель исследования, а именно охарактеризованы клиничко-лабораторные прогностические факторы, которые определяют исход ожоговой травмы и риск отторжения аутотрансплантата, а также определены сроки проведения лабораторных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что клинические данные пациентов с ожоговой травмой являются недостаточно диагностически значимыми в отношении прогноза исхода ожоговой травмы и успешности проведения свободной аутодермопластики.
2. Показатели общеклинического, биохимического анализов крови, применяемые в рутинной практике комбустиологических отделений, не показали достоверной значимости в отношении прогноза исхода ожоговой травмы и готовности к проведению свободной аутодермопластики.
3. Значимыми клинико-лабораторными показателями, отражающими тяжесть ожоговой травмы и свидетельствующими о системном воспалительном ответе, являются иммунологические показатели, а именно - высокие уровни интерлейкинов 6, 8, TNF и активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA DR⁺.
4. При ожоговой травме наиболее информативными для прогноза летальности являются клинико-лабораторные показатели концентрации интерлейкина 6 (460,0 пг/мл), относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов (12,1 %), превышение пороговых значений которых определяют неблагоприятный исход ожоговой травмы.
5. При ожоговой травме наиболее значимыми для прогноза успешности свободной аутодермопластики являются клинико-лабораторные показатели концентрации интерлейкина 8 (менее 46 пг/мл), матриксной металлопротеиназы 9 (менее 41 нг/мл), относительного содержания активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA DR⁺ (менее 11,1 %), превышение пороговых значений которых увеличивают риск отторжения аутотрансплантата.
6. Повышение концентрации матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) выше 41 нг/мл в крови больных с ожоговой травмой накануне проведения САДП свидетельствует о преобладании процессов фиброобразования в ране, что препятствует активному приживлению аутотрансплантата.
7. Выявлены прямые корреляционные зависимости между количеством Т-регуляторных лимфоцитов и концентрациями интерлейкина 6, интерлейкина 8, TNF при поступлении пациента в стационар, а также между относительным содержанием активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA DR⁺ и концентрациями интерлейкина 6, интерлейкина 8 накануне операции свободной аутодермопластики, что отражает взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета.
8. Использование статистической модели (чувствительность - 98,5%, специфичность - 88%), включающей количество активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA DR⁺, концентрацию интерлейкина 8 и матриксной металлопротеиназы 9, позволяет прогнозировать готовность пациента к операции свободной аутодермопластики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для персонификации терапии с целью снижения летальности от последствий ожоговой травмы необходимо при поступлении в стационар проводить иммунологическое обследование, включающее оценку относительного количества Т-регуляторных лимфоцитов и концентрации IL-6.

2. Относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов выше 12,1%, а также концентрации провоспалительного цитокина IL-6 выше 460,0 пг/мл являются неблагоприятными в отношении прогноза исхода ожоговой травмы и свидетельствуют о риске летального исхода.
3. Накануне планируемой свободной аутодермопластики следует внедрить в практику контроль относительного количества активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA-DR⁺, концентрации IL-8 и MMP-9 для оценки готовности пациента к операции.
4. Относительное содержание активированных Т-лимфоцитов CD3⁺HLA-DR⁺ - ниже 11,1 %, концентрации IL-8 - менее 46 пг/мл, матриксной металлопротеиназы 9 - менее 41 нг/мл накануне планируемой операции являются благоприятными в отношении прогноза успешности проведения свободной аутодермопластики.
5. Использование искусственной нейронной сети, включающей 3 наиболее значимых показателя (количество CD3⁺HLA-DR⁺, концентрация IL-8 и MMP 9) рекомендовано для подтверждения эмпирически выбранного срока проведения свободной аутодермопластики с целью благополучного исхода операции. Для практического применения полученной ИНС-модели возможно использование в виде скрипта пакета прикладных программ STATISTICA, результатом вычисления является бинарный ответ (1/0), где под кодом «1» зашифрован один из вариантов прогноза - отторжение аутодермотрансплантата, а под кодом «0» - успешное приживление аутодермотрансплантата.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в процессе исследования результаты являются важными в понимании особенностей участия клеточного и гуморального звеньев иммунитета в патогенезе ожоговой травмы. Наиболее важным является дальнейшее внедрение определения изученных параметров, продемонстрировавших наиболее высокие показатели клинико-лабораторной информативности, в практику как отделов клинико-лабораторной диагностики, так и комбустиологических отделений.

Представляет интерес и возможность применения разработанной прогностической модели посредством искусственных нейронных сетей (ИНС) в рамках других патологических процессов, так как это позволит с высокой степенью вероятности прогнозировать наступление того или иного события.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности «Клиническая лабораторная диагностика»:

1. Селиванов П.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Ожоговая травма: иммунологические аспекты (научный обзор) // Профилактическая и клиническая медицина. — 2020. — No 2 (75). — С. 58–63.
2. Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М., Семиглазов А.В., Зиновьев Е.В., Крылов П.К., Орлова О.В. Оценка параметров клеточного иммунитета у обожженных // Профилактическая и клиническая медицина. — 2020. — No 2 (75). — С. 80–86.

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень, рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности «Клиническая иммунология, аллергология»:

3. Селиванов П.А., Бычкова Н.В., Чиненова Л.В., Хабирова Т.Г., Калинина Н.М. Особенности цитокинового профиля у ожоговых пациентов. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №2, с. 161–174, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-161-174

Другие публикации и тезисы

4. Селиванов П.А. Применение метода проточной цитометрии в прогнозе ответа на терапию 1-й линии В-клеточного хронического лимфолейкоза / Селиванов П.А., Миролубова Ю.В. // Никифоровские чтения – 2017: передовые отечественные и зарубежные медицинские технологии. – 2017.

5. Селиванов, П. А. Оценка показателей иммунной системы пациентов с ожоговой раной до и после проведения операции свободной аутодермопластики / П. А. Селиванов, Н. В. Бычкова, Н. М. Калинина // Проблемы обеспечения безопасности при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций. – 2018. – Т. 1. – С. 574-575.

6. Селиванов, П. А. Оценка иммунной системы пострадавших с ожоговой раной, полученной в условиях чрезвычайной ситуации / П. А. Селиванов, Н. В. Бычкова, Н. М. Калинина // Проблемы обеспечения безопасности при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций. – 2018. – Т. 1. – С. 576-578.

7. Селиванов П.А. Первый опыт оценки показателей иммунной системы у пострадавших с ожоговой раной. / Селиванов П.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. // Многопрофильная клиника XXI века. Инновации в медицине. – 2019.

8. Селиванов П.А. Особенности клеточного иммунитета у пострадавших с ожоговой раной. / Селиванов П.А., Семиглазов А.В. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2019

9. Селиванов П.А. Алгоритм лабораторного обследования обожженных должен включать иммунологические показатели / Селиванов П.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. // X Международная научная конференция «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт» - 2021. – С. 298 – 301.

10. Селиванов П.А. Иммунная реактивность как прогностический критерий исходов кожной пластики / Семиглазов А.В., Зиновьев Е.В., Орлова О.В., Крылов П.К., Селиванов П.А. // X Международная научная конференция «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт» - 2021. – С. 307 – 308.

11. Селиванов П.А. Способ прогнозирования исхода операции свободной аутодермопластики у пациентов с ожоговой травмой / Селиванов П.А. // VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2021. – С. 128.

Список сокращений

ИФА – иммуноферментный анализ

ОТ – ожоговая травма

САДП – свободная аутодермопластика

AUC – площадь под кривой, area under the curve

CD – кластер дифференцировки, cluster of differentiation

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген, Human Leukocyte Antigen

IL – интерлейкин, interleukin

ММР – матриксная металлопротеиназа, matrix metalloproteinase

NK – натуральный киллер, natural killer

ROC - рабочая характеристика приёмника, receiver operating characteristic

TGF – трансформирующий фактор роста, transforming growth factor

TNF – фактор некроза опухоли, tumor necrosis factor