

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



На правах рукописи

Груздева Ольга Сергеевна

**РОЛЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, МОЛЕКУЛ
МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ, СИСТЕМЫ ПОЛ-АНТИОКСИДАНТЫ В
ПАТОГЕНЕЗЕ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

профессор К.Г. Шаповалов

Чита – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	11
1.1 Эпидемиология местной холодовой травмы	11
1.2 Этиология местной холодовой травмы	13
1.3 Патогенез местной холодовой травмы	17
1.4 Матриксные металлопротеиназы и их роль в физиологических и патологических процессах	21
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
2.1 Описание клинической группы	25
2.2 Изучение содержания матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (ММР-2, ММР-9, TIMP-1, TIMP-2), молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) в крови	30
2.3 Изучение показателей системы ПОЛ-АОС	31
2.4 Морфологическое изучение тканей	33
2.5 Компьютерный анализ микрофотографий	36
2.6 Статистическая обработка материала	39
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
3.1 Динамика матриксных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-9) и их ингибиторов (TIMP-1, TIMP-2) при отморожениях	41
3.2 Содержание молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) в системном кровотоке при отморожениях	45
3.3 Активность в системе ПОЛ-АОС в системном кровотоке при местной холодовой травме	47
3.4 Морфологические особенности изменения тканей при отморожениях	61
3.5 Морфометрические исследования толщины коллагеновых волокон при отморожениях	68
3.6 Закономерности морфологических и патофизиологических изменений в тканях при местной холодовой травме	73

3.6 Корреляционные связи патофизиологических процессов при холодовой травме	83
3.6.1 Связь между содержанием матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях	83
3.6.2 Связь показателей в системе ПОЛ-АОС при местной холодовой травме	87
3.6.3 Связь морфометрических изменений коллагеновых волокон с уровнем матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях	92
3.7 Модель прогнозирования уровня повреждения тканей на основе содержания матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях	94
3.8 Модель прогнозирования уровня повреждения тканей на основе активности в системе ПОЛ-АОС при отморожениях	98
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Холодовая травма является актуальной проблемой для большинства регионов России. Лечение глубоких отморожений связано с частой инвалидностью и большими сроками репарации тканей [37].

В раннем периоде отморожений регистрируется повреждение и дисфункция эндотелия, нарушения иннервации. В результате происходит секреция биологически активных веществ, вызывающих воспаление и вторичную альтерацию тканей зоны криодеструкции, что, в свою очередь, способствует затяжному течению репаративных процессов [67]. Возникновение инфекционно-воспалительных осложнений и необходимость выполнения калечащих и травматичных операций – обычное явление в дальнейшем течении раневого процесса. В результате этих осложнений происходит значительная утрата трудоспособности [85].

Семейство внеклеточных протеиназ, которые занимают центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах развития и ремоделирования клеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, неоангиогенезе, а также в процессах опухолевой трансформации и метастазирования являются матриксные металлопротеиназы (ММП). Активно изучается роль их в течении раневого процесса и ремоделирования тканей при ревматоидных артритах, остеоартритах, эндометриозе, аневризмах аорты, периодонтитах, аутоиммунных поражениях кожи, атероматозе, язвообразовании, сахарном диабете [101, 121; 156, 166].

Молекулы межклеточной адгезии представляют собой гетерогенную группу белков, связанных с плазматической мембраной (селектины, интегрины, кадгеринины, иммуноглобулиноподобные белки, протеогликаны), которые обеспечивают механическое взаимодействие клеток друг с другом или с компонентами внеклеточного матрикса, в том числе участвуют во

взаимодействии форменных элементов крови с эндотелиальными клетками, а также влияют на метаболизм самого эндотелия. От функционального состояния сосудистой выстилки зависит течение многих физиологических и патологических процессов в организме. Активация эндотелиальных клеток в очаге воспаления или при травме влияет на такие процессы, как миграция лейкоцитов из сосудистого русла в окружающие ткани, секвестрация и эрадикация патогенов и токсинов, ремоделирование сосудов, репарация, гемостаз. При чрезмерной неконтролируемой активации эндотелия возникают микротромбы, развивается тканевая и клеточная гипоксия, отмечается избыточная сосудистая проницаемость и гиперпродукция свободных радикалов, что способствует прогрессированию воспаления и, в итоге, приводит к вторичному повреждению тканей [61; 62].

Адаптивная реакция организма на стресс и наличие продуктов тканевого распада включает активацию перекисного окисления липидов у пациентов с криоповреждением. Дефицит макроэргов в клетках при этом приводит к возникновению «дыхательного взрыва» и избыточной генерации активных форм кислорода, которые являются инициаторами перекисного окисления липидов [65, 70].

При отморожениях повреждение тканей происходит как в результате непосредственного действия низких температур на ткани, так и вследствие реализации комплекса патофизиологических процессов после отогревания, когда возникает повышенная потребность в кислороде в высокодифференцированных тканях, что приводит к вторичным некробиотическим изменениям [85, 96, 151].

Степень разработанности темы исследования.

В настоящее время активно изучается роль матриксных металлопротеиназ при заживлении диабетических ран, при ожогах, хронических венозных язвах нижних конечностей [184, 196, 197]. Рассматриваются вопросы роли процессов перекисного окисления липидов при заживлении диабетических язв, злокачественных новообразованиях, атеросклерозе [127, 134, 146]. Изучается роль

молекул межклеточной адгезии в патогенезе меланомы, аутоимунной патологии, инфекционных заболеваниях [62, 116, 126].

Однако, отсутствуют комплексные работы по оценке MMP, молекул межклеточной адгезии и процессов ПОЛ в динамике течения раневого процесса при отморожениях как связующего звена первичной и вторичной альтерации с затяжным течением раневого процесса.

Важными связующими патогенетическими звеньями между процессами воспаления, ремоделирования и репарации тканей, между первичной альтерацией при криотравме и поздними особенностями раневого процесса могут быть металлопротеиназы, молекулы межклеточной адгезии и процессы перекисного окисления липидов. Следовательно, изучение механизмов ремоделирования тканей при холодовой травме является перспективным направлением.

Цель исследования: установить патогенетическое значение матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, молекул межклеточной адгезии и системы ПОЛ-антиоксиданты при криотравме.

Задачи исследования:

1. Установить динамику содержания MMP-2, 9 и их ингибиторов, уровень молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) в системном кровотоке при длительном течении раневого процесса у пациентов с отморожениями нижних конечностей III-IV степени.

2. Определить закономерности изменений в системе перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в системном кровотоке у пациентов с отморожениями нижних конечностей III-IV степени.

3. Выявить морфометрические изменения коллагеновых волокон тканей, окружающих зону некроза при местной холодовой травме нижних конечностей III-IV степени и установить их зависимость от содержания матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях.

4. Выявить прогностическую значимость MMP-2, 9 и их ингибиторов, молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) при длительном течении раневого процесса у пациентов с отморожениями.

Научная новизна.

Впервые выявлены механизмы вторичной альтерации при местной холодовой травме, в основе которого лежит активация матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9), молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) с развитием системного воспаления.

Установлено, что состояние системы ПОЛ-антиоксиданты при отморожениях является фактором замедления процессов репарации и усугубления течения раневого процесса за счет повышения уровня первичных продуктов ПОЛ в крови у пациентов с отморожениями в раннем и позднем реактивном периоде холодовой травмы, в периоде гранулирования и эпителизации, а также за счет повышения уровня первичных продуктов ПОЛ при увеличении объёма пораженных холодом тканей.

Показано, что у пациентов с местной холодовой травмой повышение содержания в крови матриксных металлопротеиназ, ингибиторов матриксных металлопротеиназ и молекул межклеточной адгезии в позднем реактивном периоде, периоде гранулирования и эпителизации, а также при увеличении объёма пораженных криоповреждением тканей происходит деструкция, изменение толщины и направления коллагеновых волокон в области криоповреждения.

Теоретическая и практическая значимость. В работе выявлена роль системного воспаления при участии матриксных металлопротеиназ 2, 9 и их ингибиторов, молекул межклеточной адгезии в патогенезе местной холодовой травмы конечностей. Определено влияние молекул межклеточной адгезии и системы ПОЛ-антиоксиданты в зависимости от периода холодовой травмы и площади пораженных тканей.

Полученные результаты расширяют имеющиеся сведения о механизмах холодовой травмы, что позволит улучшить диагностику и лечение пострадавших.

Практическое применение выявленных особенностей может способствовать снижению риска осложнений, сокращению пребывания в стационаре, снижению летальности, стоимости лечения и процента инвалидизации.

Предложен оригинальный способ компьютерного анализа микрофотографий тканей зоны криоповреждения на основе геоинформационных технологий (ГИС-технологий), позволяющий дифференцировать изменения коллагеновых волокон при холодовой альтерации.

На основе полученных данных (содержание в крови ММП-2, ММП-9, ТИМП-1, ТИМП-2, показатели системы ПОЛ-АОС) предложены патогенетические модели прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме.

Методология и методы исследования. Содержание матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-9) и их ингибиторов (ТИМП-1, ТИМП-2), молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) изучали с помощью диагностического планшета фирмы BioLegend – LEGENDplex™. Это иммуноанализ на основе кластеров, при котором растворимый элемент образца захватывается между двумя антителами.

Для изучения показателей перекисного окисления липидов кровь отбирали в 2 пробирки: одна служила для получения сыворотки, вторая (с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в конечной концентрации 1 мг/мл) – плазмы. Эритроцитарную массу отмывали трижды забуференным физиологическим раствором хлорида натрия.

В сыворотке и плазме крови изучали значения общих липидов, количество липидов с кратными связями, диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, концентрации ТБК-позитивного материала, активность каталазы, общую антиоксидантную активность. Эритроциты служили средой, где исследовали скорость каталазной реакции и их устойчивость к перекисному гемолизу, концентрация ТБК-позитивного материала.

Морфологическое изучение тканей проводилось на световом микроскопе Olympus CX21, микрофотосъемка на микроскопе Leica DM2500.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США). Построение графиков и диаграмм выполнено с помощью пакета Microsoft Office Excel 2013.

Методика исследования одобрена на заседании локального этического комитета при ФГБУ ВО ЧГМА Минздрава России, протокол № 93 от 09.04.2019 года.

Положения, выносимые на защиту:

1. При местной холодовой травме у пациентов развивается альтеративное воспаление, при котором происходит ремоделирование тканей зоны криповреждения с участием матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов. Активность процессов конформации межклеточного матрикса зависит от уровня холодового поражения конечности и имеет пролонгированный характер.

2. При увеличении объема пораженных действием низких температур тканей прогрессирует дисфункция эндотелия, возрастает продукция желатиназ и молекул межклеточной адгезии.

3. У пациентов с отморожениями активность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы связана с периодом травмы, степенью ее тяжести и является фактором затяжного течения раневого процесса.

4. В тканях зоны криповреждения наблюдается дезорганизация экстрацеллюлярного матрикса с качественными изменениями ширины и ориентации коллагеновых волокон.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты данного исследования планируется применять при проведении практических и теоретических занятий на кафедрах патологической физиологии, травматологии и ортопедии, анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия МЗ РФ, научно-практических конференций и циклов усовершенствования врачей хирургических специальностей.

Степень достоверности и апробация результатов. Тема запланирована и утверждена на Ученом Совете ФГБОУ ВО ЧГМА протокол № 1 от 28 августа 2019 г., регистрационная карта РК 040(14) АААА – А17 – 117030310232 – 5.

Результаты исследования доложены на XVI, XVII, XVIII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2017-2020 гг.); Всероссийской научно-практической конференции анестезиологов и реаниматологов (Чита, 2019-2020 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, написанные лично автором, а также в соавторстве. Из них 6 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (2 из которых зафиксировано в единой научной базе Scopus, 1 – в единой поисковой интернет-платформе Web of Science). Остальные научные работы опубликованы в виде тезисов в сборниках российских и межрегиональных научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы из 204 наименований. Объем работы составляет 143 страницы, в том числе 28 таблиц и 26 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность за всестороннюю помощь в сборе биологических образцов и всестороннюю поддержку на всех этапах исследования выражаю, доценту кафедры факультетской хирургии с курсом урологии ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ, доктору медицинских наук, Михайличенко Максиму Игоревичу и заведующей краевым ожоговым центром ГУЗ ГКБ №1 Михайличенко Анне Викторовне. Выражает благодарность доценту кафедры акушерства и гинекологии лечебного и стоматологического факультетов ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ, доктору медицинских наук Мудрову Виктору Андреевичу за помощь в статистической обработке материала. Автор искренне благодарен фельдшер-лаборантам ГУЗ «Забайкальское краевое патологоанатомическое бюро» за помощь в изготовление гистологических препаратов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 Эпидемиология местной холодовой травмы

Травмы, обусловленные воздействием низкой температуры, относятся к одним из серьезных проблем в военное и мирное время [14, 45, 68].

Во время войн отморожения приобретают массовый характер, отмечаются чаще даже не в морозы, а в сырую ветреную холодную погоду. Так, в Советской армии в годы Великой Отечественной войны санитарные потери от отморожений на отдельных фронтах достигали 3%, а на флоте – до 5,4% от общего количества санитарных потерь.

В мирное время масштабы поражения холодом не столь значительны. Однако природные катаклизмы, различные техногенные катастрофы, а также широкое распространение в последние годы экстремальных видов туризма объясняют сохраняющуюся во всем мире высокую частоту общего переохлаждения и отморожений, которые, зачастую, могут приводить к высокому уровню инвалидизации и даже летальному исходу пострадавших [2, 13, 15, 69, 79, 81, 114, 129, 130, 137, 142, 144, 152, 173].

Гипотермия может встретиться в любое время года. Первичная гипотермия обычно поражает молодых мужчин и детей [106, 118, 129]. Риск вторичной гипотермии выше у лиц пожилого возраста.

Частота отморожений в РФ в среднем составляет не более 0,3-1% от числа всех несчастных случаев, однако в Сибири, на Дальнем Востоке и в Северных регионах России достигает 20% от всех случаев термической травмы. В 25% случаев общая гипотермия может сочетаться с отморожениями. А в 35,2% случаев отморожения сочетаются с общей гипотермией [59, 78, 96].

По сведениям годовых отчетов главных специалистов регионов Сибирского федерального округа, средний показатель госпитализации в стационар пострадавших с холодовой травмой составлял 6,0 на 100 тыс. населения. При этом

в структуре пациентов специализированных ожоговых стационаров группа пациентов с местной холодовой травмой превышал у взрослых 10%, а у детей 2%. Неконтролируемая общая гипотермия наблюдалась в 2,4% случаев от всех пациентов, поступивших в отделения реанимации и интенсивной терапии [52].

Уровень летальности при тяжелой гипотермии, по данным литературы, составляет от 12 до 80% и зависит от возраста, предрасполагающих факторов, причин и сроков начала лечения [72, 117].

Значительное число пациентов с местной холодовой травмой имеют неблагоприятный преморбидный фон. Характерной особенностью эпидемиологии отморожений является то, что наиболее часто они встречаются у пострадавших в состоянии алкогольного опьянения (более 60% случаев), алиментарном истощении, а большинство – ведут асоциальный образ жизни [50, 104, 144, 152, 191].

При массивной кровопотере, шоке, декомпенсации функций сердечно-сосудистой системы, физической утомлённости отморожения возникают чаще и сопровождаются более глубокими поражениями.

По частоте чаще всего отморожению подвергаются конечности (стопы – более 90% случаев, кисти – 5-8% случаев); при этом чаще поражение ограничено пальцами и не распространяется выше голеностопного или лучезапястного суставов. Подобная локализация обусловлена худшим кровоснабжением периферических отделов конечностей в сравнении с другими областями тела, они более подвержены действию холода, в них быстрее развиваются гемодинамические нарушения. Кроме того, кисти и стопы в меньшей степени защищены от воздействия холода. Отморожения других локализаций (ушные раковины, нос, щёки, ягодицы, половые органы) наблюдают значительно реже [108, 142, 171, 178].

Значимость холодовых поражений обусловлена не столько относительно большим их числом, сколько сложностью лечения, длительностью утраты трудоспособности и высоким уровнем инвалидности – от 30 до 60% пациентов, перенесших глубокие отморожения, становятся инвалидами из-за вынужденных калечащих операций (ампутаций, экзартикуляций).

1.2 Этиология местной холодовой травмы

Причиной гипотермии является действие низких температур. Несмотря на сходство некоторых патофизиологических моментов, с функциональной точки зрения можно выделить неконтролируемую и контролируемую гипотермию. Неконтролируемая гипотермия носит патологический характер и делится на первичную и вторичную [183].

Неконтролируемая (непреднамеренная, случайная) первичная гипотермия развивается неожиданно и сопряжена с пребыванием в неблагоприятных условиях низкой температуры внешней среды, достаточной по интенсивности для снижения внутренней температуры тела, приводит к развитию холодовой травмы у пострадавшего [7, 106].

Неконтролируемая вторичная гипотермия возникает как осложнение другого первичного патологического процесса или состояния (болезни, травмы, отравления, хирургического вмешательства или введения препаратов), воздействующих на терморегуляцию организма. При этом основные заболевания или сопутствующая патология могут привести к развитию и прогрессированию первичной гипотермии [106].

Контролируемая (преднамеренная, управляемая, искусственная, индуцированная, терапевтическая) гипотермия, медицинская гибернация - метод управляемого снижения температуры тела или его части. Искусственная гипотермия применяется с лечебно-профилактической целью для уменьшения интенсивности обмена веществ, уровня функции тканей, органов и их физиологических систем, повышения их устойчивости к гипоксии, как во всем организме (гипотермия общая, в том числе криотерапия общая (криокамера), например, при глубокой гипотермической остановке кровообращения в сердечно-сосудистой хирургии и комплексном постреанимационном лечении, так и в отдельных органах (гипотермия локальная) – при контакте с холодными средами (гипотермия местная контактная, криотерапия локальная, криодеструкция, криолиполиз и т.д.) [5, 86].

Стремительное внедрение интервенционных технологий лечения различных заболеваний, в том числе более широкое применение искусственной гипотермии, способствует возникновению ятрогенных поражений холодом, при которых контролируемая гипотермия может перейти в неконтролируемую. Например, непреднамеренная периоперационная гипотермия - снижение центральной температуры тела ниже 36°C во время анестезии и в раннем послеоперационном периоде, которая возникает от ряда причин – от перераспределения тепла пациента или некомфортной температуры в помещениях [139, 159].

Патологическое действие холода проявляется в виде развития общего переохлаждения организма и отморожений, а также их сочетания. В зависимости от условий охлаждения и клинического течения выделяют следующие виды местной холодовой травмы:

- от действия сухого холодного воздуха;
- при контакте с охлажденными предметами (контактные);
- при длительном периодическом охлаждении (ознобление), в том числе во влажной среде (траншейная стопа) или вследствие погружения в холодную воду (иммерсионная стопа) [7].

Отморожения, возникающие под воздействием сухого холодного воздуха. Этот вид отморожения является «классическим», на долю его приходится наиболее широко распространенный вид холодовой травмы. Температура воздуха при этом всегда отрицательная и обычно колеблется от -10°C до -20°C [51]. Чаще поражаются открытые части тела – лицо, руки. Отморожения от действия холодного воздуха могут быть в форме окоченения или оледенения. При продолжительном воздействии холода возможны отморожения пальцев стоп или всей стопы целиком. При неблагоприятных условиях (ранения, алкогольное опьянение, несчастные случаи зимой вдали от жилья и т.д.) становятся возможными тяжелые отморожения конечностей, а также общая гипотермия [7].

Контактные отморожения. Такие отморожения развиваются при соприкосновении пальцев рук, языка, губ и других частей тела с резко

охлажденными, чаще металлическими предметами. Встречаются у рабочих, ремонтирующих машины на открытом воздухе, а также у детей, из озорства прикасающихся на морозе губами и языком к металлическим предметам. Могут быть в результате прямого контакта с крайне холодными веществами, такими как сухой лёд или жидкий азот [13, 51, 132].

Ознобление (*chilblains, perniosis*), холодовая аллергия, холодовой нейроваскулит – это разновидность отморожений, патологическое состояние, которое возникает в результате длительного хронического воздействия умеренных и низких температур (многократно повторяющегося действие холода). Этот вид холодовой травмы следует рассматривать как хроническое отморожение, возникающее при повторном воздействии на пострадавшего внешней среды, температура которой выше 0°C [12, 51]. Ознобление может считаться профессиональным заболеванием у моряков, рыбаков, поливальщиков рисовых и хлопковых полей, сплавщиков леса и работников других профессий, которые по характеру своей работы многократно подвергаются действию холода, ветра, повышенной влажности. Озноблению подвергаются преимущественно кожные покровы открытых частей тела и особенно кистей. Кожа пораженных участков отечна, напряжена, холодна на ощупь, болезненна. Иногда заболевание может протекать в форме дерматитов, плохо поддающихся лечению. Однако исключение повторных охлаждений, пребывание пострадавшего в условиях стойкого тепла ликвидирует болезненные явления [13, 170].

Более тяжелыми формами ознобления являются подострый вид местной холодовой травмы - траншейная/иммерсионная рука и стопа, которые развиваются при действии охлаждения во влажной среде. Способствуют возникновению «траншейной стопы» длительное вертикальное положение пострадавших, вынужденная неподвижность, тесная не просыхающая обувь [7, 14].

Иммерсионная стопа развивается при действии холодной воды на тело при его длительном пребывании в воде. Наблюдается исключительно во время аварий

кораблей и паромов на море в холодное время года у лиц, вынужденных долгое время находиться в холодной воде (ниже +8°C) [107].

При схожести этиологических факторов ознобления и «траншейной стопы» главными отличиями у них являются тяжесть заболевания (ознобление относится к легкому виду холодовой травмы) и локализация (ознобление, в отличие от «траншейной стопы», может развиваться в любой части тела).

Действие низких температур на организм человека в России, обширная территория которой расположена в северных районах, проявляется отморожением и замерзанием. Холодовая травма является одним из наиболее распространенных видов термической травмы и носит ярко выраженный сезонный характер. [90, 93, 96, 150, 163].

В последние годы отмечается большой интерес к проблеме отморожений, исследованию патогенеза, ранней диагностики глубины поражения, способов лечения и реабилитации. Однако, патогенез отморожения до конца не изучен, а результаты лечения оставляют желать лучшего [33, 90].

При использовании традиционных методов лечения последствий холодовой травмы глубокими инвалидами становятся от 30-60% пострадавших. Этот чрезвычайно высокий уровень инвалидизации является ярким подтверждением нерешенности проблемы [12, 33, 60, 92].

1.3 Патогенез местной холодовой травмы

Среди механизмов некробиотических изменений и причин гибели тканей в результате отморожений выделяют две концепции: теория непосредственного повреждающего действия низких температур на ткани и теории альтерации тканей при их отогревании [7, 151].

Одной из особенностей холодовой травмы в условиях сверхнизких температур (ниже $-30-40^{\circ}\text{C}$) является прижизненное оледенение тканей. Оледенение наступает при внутритканевой температуре, равной -8°C и ниже. При воздействии сверхнизкой температуры, в том числе при контактных отморожениях, на первый план выступает непосредственное разрушающее действие низкой температуры. В современной физиологии и биологии признана единая теория поражения холодом (P.W. Hochachka, 1986), в основе действия холода на клетку так же, как и при недостатке кислорода, лежит повышение концентрации ионов кальция в цитозоле, что дезорганизует биохимические реакции, ведет к разобщению процессов окисления и фосфорилирования и разрушению клеточных структур. При гипотермии все эти процессы развиваются чрезвычайно медленно по сравнению с гипоксией при нормальной температуре тела [130, 131, 133, 136, 140, 141].

В тоже время взгляды на патогенез отморожений изменились. Если ранее основной причиной возникновения отморожений считали непосредственное воздействие на ткани низкой температуры, то в последствии был сделан вывод о ведущей роли ишемии [7, 77].

Имеется несколько теорий патогенеза отморожений:

1. Теория непосредственного действия низких температур на ткани.
2. Теория местного нарушения кровообращения в тканях.
3. Нервно-рефлекторная теория.
4. Нейрогуморальная теория.

При отморожении структура пораженных тканей в первое время не отличается от структуры нормальных. Это объясняется тем, что под действием

низких температур после истощения возможностей местной терморегуляции происходит замедление биохимических и биологических процессов в охлажденном участке. В этих условиях не могут адекватно функционировать физиологические системы, обеспечивающие тканевое дыхание, обмен веществ, нервную регуляцию [6, 96].

Пусковыми моментами в развитии отморожений в дореактивном периоде являются сосудистый спазм от кожных сосудов по направлению к магистральным сосудам, наступающий в результате активации симпатико-адреналовой системы, угнетения противосвертывающей системы крови и нарушения тканевого дыхания за счет разобщения процессов окисления и фосфорилирования [198]. Уменьшение скорости кровотока в тканях начинается уже при температуре 23°C. Дальнейшее снижение температуры приводит к полному нарушению кровообращения. Кровоток в венах прекращается при температуре кожи 4-8°C, а в артериях – при 0°C. Однако в результате одновременного торможения метаболических процессов ткани сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени. Артериовенулярные шунты создают «короткое замыкание» в периферическом кровообращении [91]. При охлаждении живой ткани в ней повышается связывание кислорода с гемоглобином в 3-4 раза (при температуре ниже +8°C прекращается диссоциация оксигемоглобина), что сводит к минимуму разницу между содержанием кислорода и углекислого газа в артериальной и венозной крови, а это в свою очередь приводит к гипоксии тканей [198].

В условиях гипотермии клетки и ткани могут сохранять жизнеспособность в течение длительного времени. В тоже время температурную границу, при которой наступает гибель тканей, точно установить нельзя. Если уровень тканевой гипотермии, скорость её развития и продолжительность выходят за определённые критические пределы, происходят необратимые изменения в тканях [51, 41, 60].

В патогенезе некроза при отморожениях ведущая роль принадлежит именно нарушению кровообращения [8, 9, 60, 67, 87]. Основные патологические процессы в тканях развиваются при их внешнем согревании в раннем реактивном периоде,

когда возникает повышенная потребность в кислороде, что наряду с отсутствием адекватного кровообращения в конечности приводит к тяжелой гипоксии и некробиотическим изменениям (реперфузионный синдром) [73, 80, 85, 87, 96, 151, 182].

Фактически гибель тканей наступает при воздействии внешнего тепла, приводящего к активации обменных процессов в поверхностных слоях при отсутствии кровотока в глубжележащих тканях, что определяет первостепенную важность восстановления кровотока по магистральным сосудам и отогревания отмороженной конечности «изнутри-кнаружи» [34, 45, 96, 97].

Если при охлаждении происходит спазм сосудов, то в последующем при согревании спазм сменяется паретическим расширением, стазом и резким ухудшением кровотока как в микроциркуляторном русле, так и в магистральных сосудах [133, 142, 152]. При этом потребности тканей в кислороде и обмене веществ, уже не находящихся в состоянии гипотермии, возрастают. Это способствует формированию через несколько суток после травмы глубоких некрозов. Степень распространённости последних увеличивается при тромбозе магистральных сосудов [27, 60].

Патогенез траншейной/иммерсионной руки и стопы характеризуется тем, что длительные периоды тканевой гипотермии чередуются с периодами кратковременного и неполного отогревания, после которого нормализации состояния тканей не происходит [12, 45, 77]. Так последующее охлаждение наслаивается на уже существующие нарушения. При этом в тканях конечности нарушается венозный отток, за счет повышения проницаемости сосудистой стенки происходит выпотевание жидкой части крови из сосудистого русла, развивается и нарастает отек. Все это усугубляет нарушения, обусловленные действием низкой температуры, ухудшает кровообращение и трофику в пораженных тканях, приводя в конечном итоге к их омертвлению, т.е. к глубокому отморожению [45, 107, 204].

Прогрессирование повреждений связано с повышением проницаемости стенок капилляров, обусловленным действием вазоактивных веществ, прежде всего гистамина и серотонина, высвобождающихся при разрушении клеток [33].

Гистамин повышает проницаемость капилляров, вызывает резкое набухание их стенок. Серотонин обладает способностью повреждать эндотелий и провоцировать тромбообразование. В дальнейшем в участках поражения прогрессирует тромбоз сосудов, обусловленный активацией системы гемостаза и угнетением фибринолиза [133, 178, 198].

Существенную роль играют и нарушения микроциркуляции, вызванные не только местным воздействием холода, но и изменениями реологических свойств крови и водно-солевого обмена [59, 60, 95]. Помимо этого, большое значение в патогенезе местного холодового поражения имеют вторичные расстройства микроциркуляции, связанные с развитием прогрессирующего отека тканей с их сдавлением в костно-фасциальных футлярах и компрессионной ишемией, развитием тромбозов [27, 178, 192, 198].

Большинство форм отморожений характеризуется развитием и прогрессированием вторичного некроза [73, 96]. Необратимые изменения при отморожениях редко распространяются проксимальнее лучезапястного и голеностопного суставов, так как поражение проксимальных отделов конечностей, особенно нескольких, в дальнейшем сопровождается развитием общей гипотермии, несовместимой с жизнью [91, 106].

Общие симптомы при отморожении связаны как с всасыванием продуктов распада в области некротизированных тканей и присоединением инфекции, так и с непосредственным влиянием низких температур на внутренние органы [45, 108].

Следует отметить, что патологические процессы в клетках и тканях, пострадавших с холодовой травмой в ранние сроки с момента криовоздействия характеризуются высокой обратимостью, поэтому неотложные лечебные мероприятия, будучи патогенетически обоснованными, способны предупредить развитие необратимых изменений или существенно уменьшить их распространенность. В результате улучшаются результаты лечения и качество жизни пострадавших с холодовой травмой [70].

1.4 Матриксные металлопротеиназы и их роль в физиологических и патологических процессах

Матриксные металлопротеиназы (ММП) являются одними из главных маркеров состояния межклеточного матрикса. Принадлежат к семейству цинковых металлопротеиназ, функция которых связана с метаболизмом белков межклеточного матрикса. Эти ферменты играют решающую роль при развитии таких физиологических процессов, как морфогенез, резорбция и ремоделирование тканей, адгезия, миграция, дифференцировка и пролиферация клеток, а также при заболеваниях (гломерулонефрит, ревматоидный артрит, пародонтиты и др.), альтерации альвеолокапиллярной мембраны [76, 101, 111, 112, 189]. ММП играют особую роль в генерализации процессов инвазии и метастазирования опухолей [82, 161, 165].

ММП синтезируются и секретируются рядом клеток: эпителиальными клетками, фагоцитами, фибробластами, лимфоцитами и онкогенно-трансформированными клетками [119, 195].

Семейство матриксных металлопротеиназ включает 20 ферментов, способных расщеплять практически все компоненты внеклеточного матрикса соединительной ткани. Количество вновь синтезируемых ММПs регулируется в основном на уровне транскрипции, а протеолитическая активность существующих ММПs контролируется как активацией проферментов, так и ингибированием активных ферментов эндогенными ингибиторами, α 2-макроглобулином и тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМР). По специфичности ММП можно разделить на коллагеназы (ММП-1, -8 и -13), желатиназы (ММП-2 и -9) и стромелизины (ММП-3 и -10). Известны также 4 представителя семейства тканевых ингибиторов ММП (ТИМР 1-4) [109].

Коллагеназы разрушают коллагены типов 1-3, 7 и 10, желатиназы – коллаген типа 4 и денатурированные коллагены. Стромелизины расщепляют коллаген 4, 5 и 7 типа, фибронектин, ламинин, а также протеогликаны. Кроме сходства на уровне аминокислотной последовательности, все ММП формируются из

неактивных предшественников, которые превращаются в активные протеиназы под воздействием внеклеточных факторов [109].

Первой обнаруженной активностью ММР была их способность гидролизовать белки внеклеточного матрикса [39, 109, 164, 169]. Ремоделирование ткани, поддержание ее архитектоники и гомеостаза, а также освобождение пространства для миграции клеток, что особенно важно для эмбриогенеза, имплантации эмбриона, роста и развития, ангиогенеза, заживления ран, обеспечивается деградацией компонентов внеклеточного матрикса [156, 164, 169]. ММР могут воздействовать на межклеточные контакты и модулировать взаимодействие «клетка – матрикс», что критично для клеточной пролиферации и дифференцировки [39, 124, 128].

Матриксные металлопротеиназы освобождают цитокины и факторы роста из внеклеточного матрикса и служат резервуарами для биологически активных молекул [157, 169, 194, 203]. ММР гидролизуют различные белковые факторы роста, тирозинкиназные рецепторы, цитокины, хемокины, другие ММР, компоненты комплемента, молекулы адгезии и мембранные белки (например, E-кадхерин, β 4 интегрин, CD44) [157]. Это приводит как к активации, так и к инактивации соответствующих субстратов. В результате ММР регулируют различные механизмы иммунного ответа, клеточной пролиферации, апоптоза, дифференцировки и миграции, являясь важным компонентом нормального функционирования тканей и органов [156, 157, 169].

ММР-2 (желатиназа А) экспрессируется на мезенхимальных клетках (главным образом в фибробластах) в период развития и регенерации ткани [54, 101]. Также синтезируется нейтрофилами, макрофагами и моноцитами. Уровень экспрессии ММР-2 постоянен и обычно не индуцируется цитокинами или факторами роста [201]. ММР-2 необходима для ингибирования процесса ангиогенеза в опухолях, и ее уровень повышен в эндотелии сосудов опухоли и в моче пациентов с различными опухолевыми образованиями [188]. Кроме того, ММР-2 наряду с некоторыми другими ММРs (а именно ММР-7, ММР-9 и ММР-12) могут ингибировать ангиогенез. Это связывают с их способностью

образовывать антиангиогенные полипептиды путем превращения плазминогена в ангиостатин, который угнетает пролиферацию и усиливает апоптоз клеток эндотелия [155]. MMP-2 совместно с MMP-9 участвуют в деградации коллагена IV типа, главного компонента базальных мембран и желатина (денатурированного коллагена). MMP-2 может также разрушать другие типы коллагенов (V, VII и X), эластин и фибронектин, принимает участие в процессинге многих других молекул, модулируя их функции различными способами [101, 156]. Например, MMP-2 расщепляет моноцитарный хемотаксический белок-3, что приводит к уменьшению воспаления и обеспечивает вазоконстрикцию. Двойной эффект действия MMP-2 (как провоспалительный, так и противовоспалительный) описывается различными исследователями [186, 188].

MMP-9 (известная как желатиназа В) секретируется как профермент. Источниками MMP-9 являются кератиноциты, моноциты, лейкоциты, макрофаги и фибробласты [120]. Базальные уровни MMP-9 обычно низки, ее экспрессия может индуцироваться различными цитокинами/хемокинами, включая TNF- α (фактор некроза опухолей-альфа), и главным образом- секретируется воспалительными клетками. MMP-9 принимает участие в процессах воспаления (так же, как и MMP-2, может обладать про- и противовоспалительной активностью), ремоделирования тканей и репарации, мобилизации матрикс-связанных факторов роста и процессинга цитокинов [156, 201, 202].

MMP-9 ассоциирована с хроническими воспалительными аутоиммунными заболеваниями, включая ревматоидный артрит, синдром Шегрена, идиопатический увеит и системную красную волчанку. Более того, чрезмерная экспрессия MMP-9 отмечалась при различных патологических состояниях, характеризующихся избыточным фиброзом, включая идиопатический легочный склероз, бронхиальную астму, экспериментальный билиарный фиброз, хронический панкреатит [120, 186, 200].

В организме существует биологический механизм ограничения протеолиза тканей, вызванного активными MMPs, в виде секреции клетками стромы тканевых ингибиторов металлопротеаз (TIMP), которые могут блокировать

разрушение экстрацеллюлярного матрикса [101]. TIMP представляют собой белки небольшого размера, способные формировать нековалентные комплексы со многими членами семейства матриксных металлопротеаз. Кроме TIMPs ингибировать металлопротеиназы могут различные макроглобулины (α 1-макроглобулин, α 1-ингибитор-3) [113, 162].

TIMP действуют как ключевые ингибиторы MMPs в тканях путем связывания в активном сайте и формирования стабильного, инактивного комплекса фермент-ингибитор. TIMP отличаются в своей специфичности ингибирования желатиназ, с наибольшей активностью TIMP-2 к MMP-2, и TIMP-1, преимущественно связывающейся с MMP-9 [189, 201].

TIMP-1 представляет собой белок, местом экспрессии которого являются яичники и костная ткань. Показано, что TIMP-1 ингибирует развитие опухоли, метастазирование и ангиогенез [194].

Экспрессия TIMP-2 наблюдается как в нормальных, так и в опухолевых тканях [39, 40, 54, 101]. Сывороточные уровни TIMP-2 повышены у пациентов с системным склерозом. Кроме своей обычной ингибиторной роли, низкая концентрация TIMP-2 способствует индукции активации MMP-2 при помощи MMP-14, формируя трехмолекулярный комплекс этих белков на поверхности клетки [113].

Таким образом, роль матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов при патологических процессах очевидна. Поэтому ингибиторы этих ферментов активно исследуются на предмет применения в качестве терапевтических средств при различных заболеваниях. Большая часть исследуемых препаратов находится на стадии клинических испытаний. В связи с этим одной из проблем является их низкая или недостаточная активность *in vivo*. Учитывая известные свойства MMPs, а также перспективы дальнейшего изучения этих ферментов, возможно внедрение новых препаратов для лечения различных заболеваний.

Учитывая то, насколько серьезной проблемой в настоящее время являются отморожения, изучение процессов репарации при криотравме открывает широкие перспективы для понимания патогенеза местной холодовой травмы и разработки новых методов лечения.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Описание клинической группы

В исследование включены 185 больных с отморожениями нижних конечностей III и IV степени тяжести и в разные периоды местной холодовой травмы: в позднем реактивном периоде (5 сутки), а также в периоде гранулирования и эпителизации (30 сутки). Уровень пораженных низкими температурами тканей отличался. Из пациентов, включенных в исследование, сформировано три группы в зависимости от объема пораженных холодом тканей: 1 группа – отморожение на уровне пальцев, 2 группа – отморожение на уровне плюсны, 3 группа – отморожение более проксимальных сегментов конечностей, всей стопы или дистального сегмента голени.

У 95 больных, включенных в исследование, проведено изучение содержания в крови матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, и содержания молекул межклеточной адгезии. У других 90 больных с местной холодовой травмой исследовалось состояние показателей системы ПОЛ-антиоксиданты в крови. У 84-х пациентов с МХТ производился забор тканей зоны демаркации. В результате проведенных исследований было сформировано две группы из числа всех больных (Таблица 2.1).

Проведенное исследование относится к одноцентровому проспективному открытому нерандомизированному контролируемому клиническому исследованию. Учитывая нестандартную процедуру обследования пациентов, исследование относится к интервенционному, по длительности к продолжительному.

В работе с людьми соблюдались этические принципы, изложенные в статье 24 Конституции РФ и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964). Пациенты

проходили стационарное лечение в Краевом ожоговом центре ГУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Читы в период с 2016 по 2020 гг.

Проведенное исследование одобрено на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО ЧГМА № 93 от 09.04.2019 года.

Таблица 2.1 – Клинические группы по видам проведенного исследования

Виды исследования	Количество пациентов	%
Изучение содержания матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, и содержания молекул межклеточной адгезии в крови	95	51,3
Изучение показателей системы ПОЛ-АОС	90	48,7

В группу исследования включались: здоровые люди и пациенты с отморожениями нижних конечностей, а также их центрифугированная кровь, ткани зоны криповреждения в зоне демаркации и ткани умерших людей от острой травмы без тяжелой сопутствующей патологии. Возраст пациентов находился в пределах от 25 до 45 лет (Таблица 2.2). Мужчины составляли большую часть группы больных – 78 %, женщины – 22 %. Для каждого типа исследования, приведенного в Таблице 2.1, группа контроля состояла из 30 относительно здоровых доноров аналогичной возрастной категории. В группе контроля соотношение доноров по половому признаку соответствовало: мужчины – 74 %, женщины – 26 %.

Таблица 2.2 – Распределение пациентов по возрасту

Возраст	Больные	%
25-30	31	17
30-35	45	24
35-40	72	39
40-45	37	20

Критериями исключения являлись: возраст менее 18 лет и более 50 лет, туберкулез, кахексия различной этиологии, сепсис, ХОБЛ, сахарный диабет, заболевания сосудов и нервов конечностей, ревматизм, преморбидные нарушения сердечного ритма, острые воспалительные заболевания, атеросклероз, острое нарушение мозгового кровообращения.

Альтерация низкими температурами, приводящая к возникновению локальной холодовой травмы III-IV степени, отмечалась в условиях Забайкалья с конца ноября по март. У больных с глубокими отморожениями наблюдались поражения кожи I-II степени. Сроки госпитализации в стационар с момента криотравмы варьировали по причине того, что некоторые пациенты пренебрегали медицинской помощью. Распределение пациентов относительно объема тканей и периодов клинического сравнения приведено в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Уровень поражения конечностей и периоды клинического сравнения больных с холодовой травмой

Типы исследования	Уровень поражения и периоды	Количество пациентов	%
Изучение содержания матричных металлопротеиназ и их ингибиторов, и содержания молекул межклеточной адгезии в крови	Пальцы стоп (1 группа)	35	36,8
	Плюсны (2 группа)	31	32,6
	Голени (3 группа)	29	30,6
	Поздний реактивный период (5 суток)	43	45,3
	Период гранулирования и эпителизации (30 суток)	52	54,7
Изучение показателей системы ПОЛ-АОС	Пальцы стоп (1 группа)	36	40,0
	Плюсны (2 группа)	29	32,2
	Голени (3 группа)	25	27,8
	Ранний реактивный период (2 суток)	30	33,3
	Поздний реактивный период (5 суток)	40	44,5
	Период гранулирования и эпителизации (30 суток)	20	22,2

У всех пострадавших с местной холодовой травмой регистрировалось поражение нижних конечностей, в основном, их дистальных отделов. Распределение сегментов пораженных конечностей приведена в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Локализация отморожений III-IV степени

Сегмент	Количество	%
Правая нижняя конечность	16	8,6
Левая нижняя конечность	26	14,1
Обе нижние конечности	143	77,3

Из приведенных данных следует, что у большинства пациентов (77,3 %) распространены отморожения обеих конечностей.

Наиболее распространенным типом отморожений были острое и подострое, вызванные холодным воздухом. Вместе с ними встречались и подострые случаи, такие как траншейная стопа и контактное отморожение.

В течение отморожений криотравма может осложняться анаэробной инфекцией [6, 45]. Однако, за период наблюдений за пациентами таких явлений нами не было зарегистрировано. В таблице 2.5 представлено распределение пациентов в зависимости от форм отморожения.

Таблица 2.5 – Распределение пациентов в зависимости от форм отморожения

Форма местной холодовой травмы	%
Поражения холодным воздухом	83
Контактные отморожения	14
«Траншейная стопа»	3

Пострадавшие с развитием флегмоны, гнойных затеков, сопровождавшихся в тяжелых случаях сепсисом, исключались из исследования, в связи с выраженной воспалительной реакцией и изменением состояния систем микроциркуляции, гемостаза и иммунитета.

Схема дизайна исследования представлена на Рисунке. 2.1.

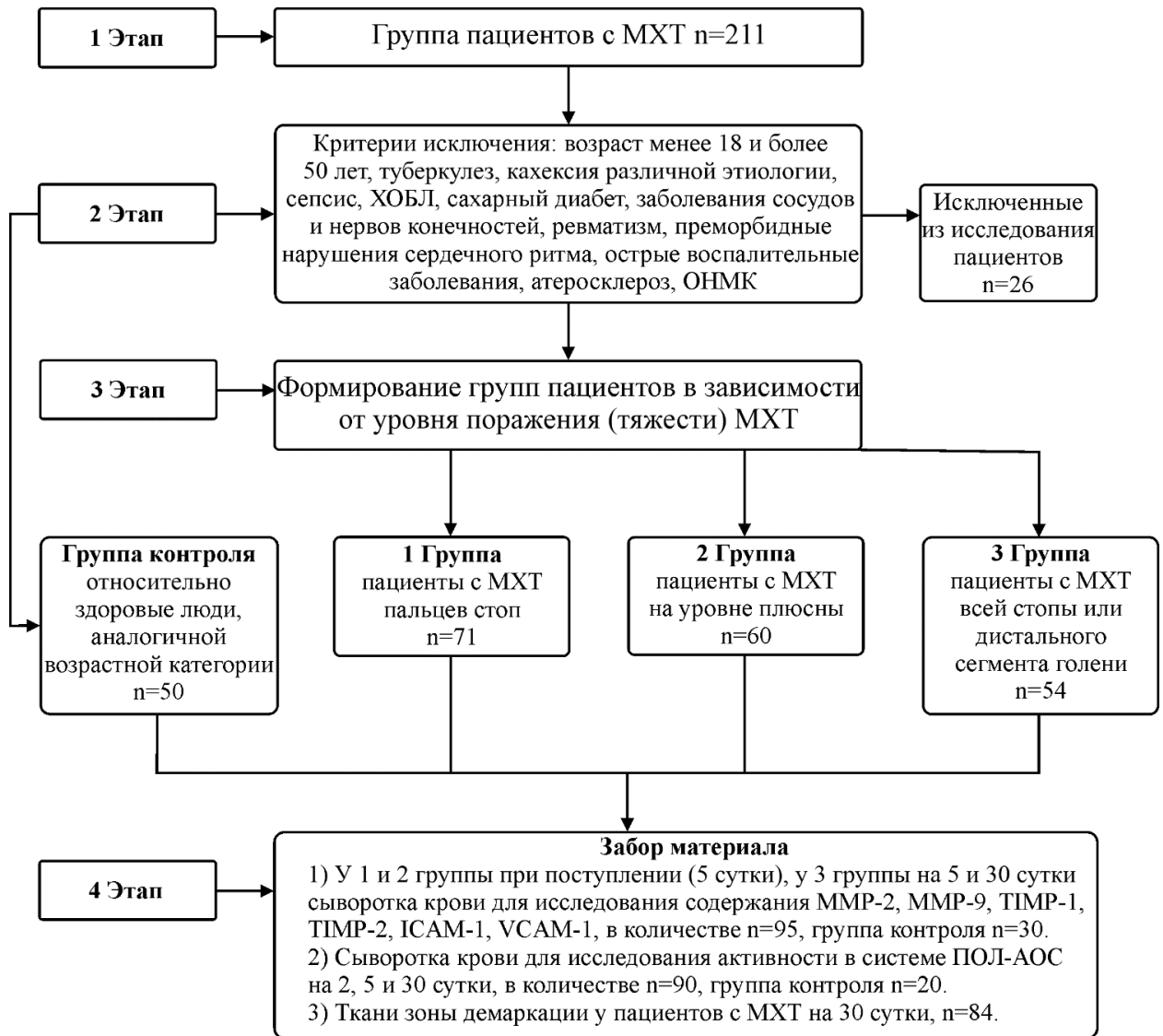


Рисунок – 2.1 Схема дизайна исследования

2.2 Изучение содержания матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2), молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) в крови

Содержание матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, а также молекул межклеточной адгезии исследовали с помощью диагностического планшета LEGENDplex™ фирмы BioLegend (San-Diego, CA92121, USA, 2019).

Наборы LEGENDplex™ BioLegend представляют собой заданные панели с набором характеристик. Иммуноанализ на основе микросфер позволяет количественно определить растворимые аналиты одновременно в биологических образцах с использованием проточного цитометра.

2.3 Изучение показателей системы ПОЛ-АОС

В основу определения диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, а также веществ с изолированными двойными связями взят метод И.А. Волчегорского [83].

Для изучения уровня промежуточных интермедиатов свободнорадикального окисления липидов использовали тест Л.И. Андреевой с тиобарбитуровой кислотой [4].

Метод определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови по Промыслову М.Ш. и соавт.

Переокисную резистентность эритроцитов определяли согласно описанию Г.А. Яровой [102].

Определение активности каталазы осуществляли по методу М.А. Королюк и соавторы [56].

Для исследования показателей перекисного окисления липидов отбирали кровь в две пробирки: одна служила для получения сыворотки, вторая (с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в конечной концентрации 1 мг/мл) – плазмы. Эритроцитарную массу отмывали трижды забуференным физиологическим раствором хлорида натрия.

В сыворотке и плазме крови исследовали значения общих липидов, количество липидов с кратными связями, диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, концентрации ТБК-позитивного материала, активность каталазы, общую антиоксидантную активность. Эритроциты служили средой, где изучали скорость каталазной реакции и их устойчивость к перекисному гемолизу, и концентрации ТБК-позитивного материала.

Определение содержания ТБК-активных веществ в эритроцитах крови

Принцип метода: метод основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой.

Определение общей антиоксидантной активности в крови

Принцип метода определения общей антиоксидантной активности заключался в том, что сернокислородное железо продуцировало свободные радикалы, тем самым активизируя перекисное окисление липидов. Полученные показатели характеризовали количество субстрата, подвергшегося перекисному окислению и количество веществ, защитившихся от такового.

Определение перекисной резистентности эритроцитов

Перекисную резистентность эритроцитов исследовали согласно описанию Г.А. Яровой и выражали в процентах гемолизированных клеток [102].

Измерение активности каталазы в крови

Принцип метода измерения активности каталазы заключался в способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [56].

2.4 Морфологическое изучение тканей

Материал забирался на 30-е сутки с момента получения травмы. Фрагменты ткани размером $1 \times 1 \times 0,5$ см. забирались скальпелем под местной анестезией при проведении хирургической обработки в зоне поражения на границе поврежденных и здоровых тканей (в зоне демаркации). Препараты изготавливались в лаборатории на базе ГУЗ «Забайкальское краевое патологоанатомическое бюро» г. Читы. Изучение микропрепаратов проводилось на микроскопе Olympus CX21, микрофотосъемка на микроскопе Leica DM2500 на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

После взятия и вырезки материала проводились:

1. Фиксация. Взятый для гистологического исследования материал подвергался фиксации в 10% растворе формалина в течение 1 суток.

2. Промывка в воде. После фиксации материал промывался в течение 2 часов в проточной воде, для избавления его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.

3. Обезвоживание и уплотнение производилось постепенно путем проведения ткани через спирты возрастающей крепости: 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°. В каждом спирте кусочки находились в течение 1 суток.

4. Заливка. При заливке кусочки предварительно пропитывались ксилолом. При заливке в парафин кусочки из абсолютного спирта переносились в смесь абсолютного спирта с ксилолом, взятых поровну, затем чистый ксилол и, наконец, в расплавленный насыщенный раствор парафина в хлороформе, где они находятся в термостате при температуре 37° 1 сутки. Дальнейшая заливка проводилась в термостате при температуре 54°-56° в трех порциях парафина. Окончательная заливка проводилась в парафин с добавлением воска, который наливали в заливочные блоки, а затем после появления на поверхности парафина пленки, погружали в воду. Происходило полное затверждение парафина. Кусочки с

окружающим их парафином извлекали из блоков и с помощью расплавленного парафина, наклеивали на кассеты, получают парафиновые блоки.

5. Приготовление срезов. Срезы с блоков изготавливали на ротационном микротоме НМ325 (Рисунок 2.4).

В специальных устройствах микротом зажимали парафиновый блок и микротомный нож. При каждом скольжении ножа в плоскости параллельной поверхности блока получали срезы толщиной 5-7 микрон с парафиновых блоков.

6. Окрашивание.

1. Перед окраской из парафиновых срезов удаляли парафин (растворением в ксилоле). Проводили по спиртам нисходящей концентрации и доводили до воды (две порции ксилола – 3-5 минут, 96° этанол – 3 минуты, 80° этанол – 3 минуты, 70° этанол – 3 минуты, дистиллированная вода – 5 минут). Окрашивали гематоксилином 7-10 минут.

2. Промывали в дистиллированной воде – 5 минут.

3. Дифференцировали в 1% соляной кислоты на 70° этаноле до побурения срезов.

4. Промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов.

5. Окрашивали водным раствором эозина 0,5-1 минуту.

6. Промывали в трех порциях дистиллированной воды для удаления избытка эозина.

7. Удаляли воду из срезов в одной порции 70° этанола, двух порциях 96° этанола. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты.

8. Просветляли срезы в двух порциях ксилола – 1 минута.

9. Производили окончательное обезвоживание срезов в двух порциях ксилола. Пребывание срезов 2 минуты.

10. Заключение срезов. Окрашенные и промытые в воде срезы во избежание помутнения обезвоживали в спиртах (70°, 96°), просветляли в ксилоле, а затем на

предметное стекло, где находится срез, помещали каплю бальзама и срез накрывали покровным стеклом.

На рисунке 2.2 продемонстрированы гистологические препараты, изготовленные по описанной методике.

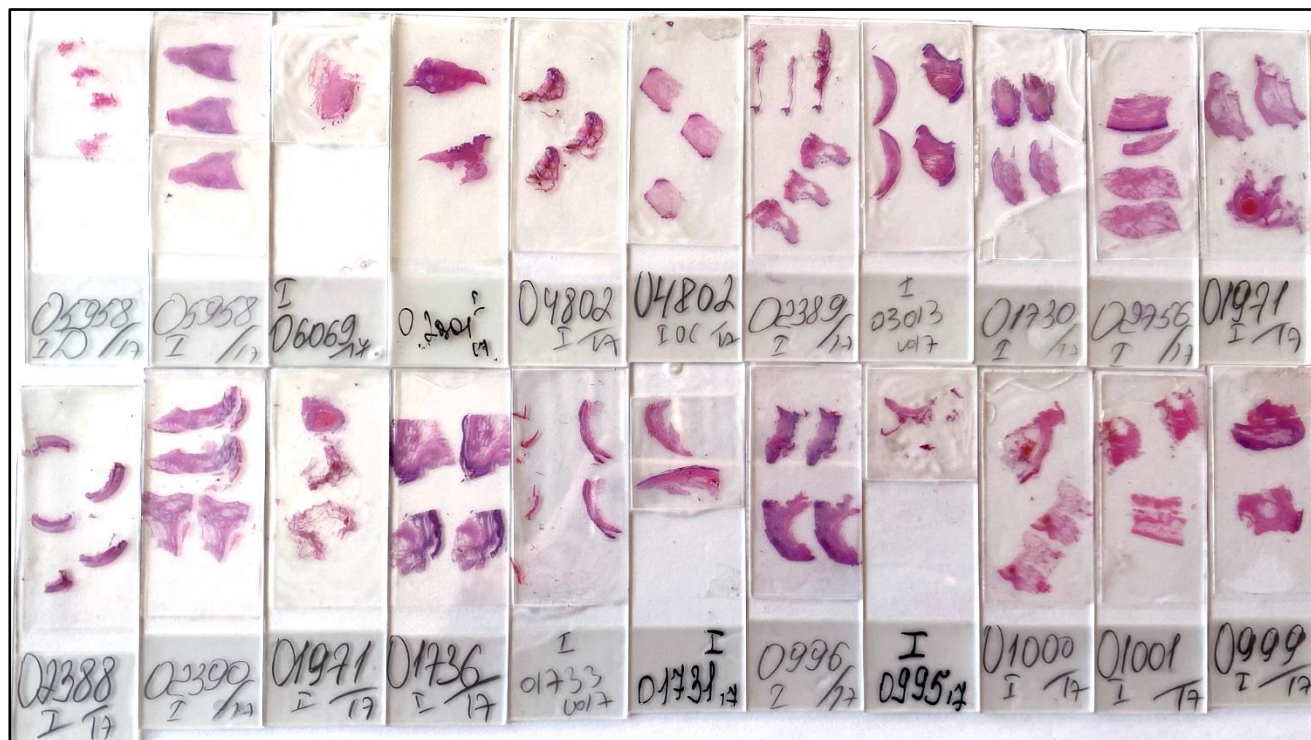


Рисунок 2.2 – Гистологические препараты тканей пациентов с местной холодовой травмой. Фото автора

Морфометрические исследования по определению толщины коллагеновых волокон выполнены для группы контроля и пациентов с отморожениями на 30-е сутки при местной холодовой травме. Измерения толщины коллагеновых волокон выполнено на основе визуальных измерений характерных участков микрофотографии, участки для измерений выбраны исходя из диагностического опыта. Для каждой микрофотографии выполнялось не менее 10 измерений мощности коллагеновых волокон, затем результаты заносились в таблицу.

2.5 Компьютерный анализ микрофотографий

Одним из наиболее характерных признаков развития патологических процессов в тканях является изменение структуры коллагеновых волокон. В общем случае они включают в себя изменение толщины волокон и переход от мелкодисперсной тонковолокнистой структуры к крупнодисперсной структуре с утолщенными линейными структурами.

С целью снижения субъективной составляющей при оценке образцов тканей представляется целесообразным применить некоторые численные оценки текстуры образца. Общей целью данного подхода является разработка комплекса численных характеристик, позволяющих отнести тот или иной образец к числу имеющих патологические признаки, либо к образцу здоровых тканей.

Следует отметить, что непосредственная оценка спектральных характеристик образцов (цвет) не является надежным источником классифицирующих признаков. Цвет может меняться в зависимости от использованных реактивов и характеристик подсветки. Поэтому оценка именно текстуры микрофотографии является наиболее надежным и перспективным подходом.

Любое растровое изображение может быть рассмотрено как поверхность. В этом случае черному пикселу (яркость 0) будет соответствовать высота 0 м, а белому (яркость 255) – высота 255 м. Приняв размер пиксела за некую фиксированную пространственную величину (например, также за 1 м), получаем трехмерную поверхность.

Для анализа поверхностей существует довольно большой инструментарий ГИС-технологий [36, 49, 75, 99]. В данном случае наиболее оправданным является использование такой характеристики поверхности, как коэффициент кривизны (КК) в данной точке. Расчет численной характеристики кривизны идет по участку размером 3×3 ячейки, итоговые результаты присваиваются центральной ячейке.

Для микрофотографии (преобразованной в поверхность) с большим числом тонких контрастных волокон и изгибов значение КК будет значимо выше, чем для

изображения с меньшим числом более толстых волокон [110]. Благодаря этому значение КК можно использовать в качестве надежного численного критерия отнесения образца к классу имеющих патологии, либо свободного от таковых.

Для анализа подобным образом было принята следующая последовательность действий:

1. Создание поверхностей.

Для этого RGB-изображение в формате JPG (оригинальная микрофотография с разрешением 1 пиксел = 0,64 мкм) подвергалось преобразованию в градации серого методом поканального осреднения (численные значения яркостей каждого пиксела в каналах RGB складываются и делятся на 3). Операции контрастирования, коррекции гаммы, гистограммы и прочие цифровые способы коррекции яркостей не применялись с целью обеспечения максимально однородных, независящих от содержимого изображений спектральных яркостей образцов. Полученное серое изображение преобразовано в поверхность типа ArcINFO GRID (матрица со значениями высоты), где каждой ячейке сопоставлена высота, численно равная яркости серого изображения по шкале от 0 до 255.

2. Фильтрация поверхности.

Полученное изображение может содержать в себе дефекты оцифровки (технические особенности микроскопа) и сжатия (дефекты алгоритма JPG). Образцы разных исследователей могут иметь различные виды артефактов. С этой целью итоговая поверхность была подвергнута фильтрации. Для фильтрации использован метод скользящего окна с радиусом 2 пиксела, форма окна – круг. Суть алгоритма фильтрации – вокруг текущей ячейки поверхности строится круг радиусом 2 пиксела, яркости всех пикселов внутри круга складываются и делятся на число ячеек. Полученное среднее значение присваивается текущей ячейке. Далее окно анализа смещается на один пиксел в сторону.

3. Расчет поверхности кривизны.

Поверхность рассчитывается с использованием пакета ArcGIS с использованием функции Curvature. Результат расчета – поверхность значений КК в диапазоне значений – от 0 до 1800.

4. Расчет статистики Curvature.

Для каждого изображения была сформирована блочная структура в виде квадратов размером 100x100 пикселей. Размер блока обусловлен размерами цифрового изображения поля зрения и размерами коллагеновых волокон. Необходимо соблюдение принципа, когда размер блока хотя бы на порядок больше средней толщины волокна, и когда поле зрения хотя бы на порядок больше блока. Размер блока 100x100 пикселей удовлетворяет этим условиям.

Для каждого изображения и для каждого блока была рассчитана статистика значений КК. Значение величины «Среднее» не является репрезентативным, так как у всех блоков и изображений оно близко к 0 – это следствие особенностей работы самого алгоритма. Однако значение стандартного отклонения для величин КК показывает наличие двух хорошо выраженных классов, коррелирующих с наличием или отсутствием патологий на изображениях.

Расчет значений стандартных отклонений не для изображений целиком, а для блоков (с их последующей фильтрацией) позволяют исключить из рассмотрения образцы тканей и структур, присутствующие на образцах тканей, но не являющиеся предметом анализа (фон, посторонние включения, сопутствующие ткани и прочее).

5. Отображение результатов.

Результаты компьютерного анализа микрофотографий представляются в виде классифицированных изображений по классам: Контроль → Переходный класс → Больные.

2.6 Статистическая обработка материала

При проведении статистической обработки материалов исследования автор руководствовался принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL) [18, 84, 88]. Учитывая численность исследуемых групп, оценка нормальности распределения количественных признаков проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Учитывая распределение данных отличное от нормального, результаты исследования представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3). Ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (H) выполняли для сравнения трех и более независимых групп по одному количественному признаку. Затем, при наличии статистически значимых различий проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни (U) с поправкой Бонферрони [19, 63]. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных исследования проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса, позволяющего оценить значимость между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым [18, 42, 46, 64, 88].

Для оценки связи между двумя количественными показателями при отсутствии нормального распределения использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Исходя из полученного значения r_s , выявлена теснота связи и ее направление (прямая или обратная) по шкале интерпретации значений критерия Крамера (Таблица 2.6), которая похожа на шкалу Е.П. Голубкова. Знак коэффициента корреляции (r_s) указывает на направление связи: положительный – прямая; отрицательный – обратная. Достигнутый уровень статистической значимости обозначался параметром (p) [57, 58].

Таблица 2.6 – Шкала интерпретации значений коэффициентов корреляции (rS)

Коэффициент корреляции (rS)	Сила взаимосвязи
менее 0,10	Несущественная
0,11-0,20	Слабая
0,21-0,40	Средняя
0,41-0,60	Относительно сильная
0,61-0,80	Сильная
0,81-1,00	Очень сильная

Для изучения связей и важности независимых переменных (важность предикторов) в исследуемых группах и периодах использовался многослойный перцептрон. Для определения порога обнаружения тяжелой степени отморозжения применялся анализ с классификацией или построение ROC-кривых (ROC-анализ). Интерпретация ROC-кривых проводилась на основе показателя AUC (площадь под кривой).

Для построения моделей прогнозирования событий использовался регрессионный анализ [57, 148]. Переменные, значимость которых превышала $p=0,05$ исключались из модели прогнозирования.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США). Построение графиков и диаграмм выполнено с помощью пакета Microsoft Office Excel 2013.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Динамика матриксных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-9) и их ингибиторов (ТИМР-1, ТИМР-2) при отморожениях

Результаты исследования уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов выполнены по периодам отморожения и по степени тяжести поражения. Результаты исследования представлены в таблицах 3.1 и 3.2 в виде медианы, первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3). Оформление результатов выполнено в виде боксплотов содержаний (ММР-2, ММР-9, ТИМР-1, ТИМР-2) на рисунках 3.1-3.8.

При анализе полученных данных выявлено значительное повышение уровня ММР-2 и ММР-9 в крови пациентов с МХТ относительно группы контроля в ранние сроки криоповреждения. Необходимо отметить, что уровень ММР-2 снизился до значений контрольной группы, а показатели ММР-9 оставались значительно выше нормы в поздние сроки с момента травмы. Этот факт патогенетически обосновывает большое количество поздних осложнений у пациентов с МХТ.

В позднем реактивном периоде у пациентов с криоповреждением уровень ММР-2 в 3,4 раза выше относительно контроля ($p=0,011$), в периоде гранулирования и эпителизации – значения ММР-2 не отличаются от контрольных показателей ($p=0,103$) (Таблица 3.1). Уровень коллагеназы В (ММР-9) ($p=0,002$), в ПГЭ – в 12,5 раз выше относительно группы контроля, пострадавших с местной холодовой травмой. В ПРП в 14,5 раз выше показателей контроля ($p=0,000094$) (Таблица 3.1).

В позднем реактивном периоде у пациентов с криоповреждением уровень ТИМР-1 в 1,7 раза выше относительно контроля ($p<0,001$), в периоде гранулирования и эпителизации – значения ТИМР-1 увеличилось в 2 раза

относительно контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.1). Уровень TIMP-2 у пациентов в ранние сроки с момента криповреждения в 2,3 раза больше показателей контроля ($p < 0,001$), в поздние сроки – в 2,2 раз больше относительно группы контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Содержание матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови у пациентов в разные периоды криповреждения (Me [Q1; Q3])

	MMP-2 (нг/мл)	MMP-9 (нг/мл)	TIMP-1 (нг/мл)	TIMP-2 (нг/мл)
Контроль, n=30	2,30 [2,15; 2,47]	32,05 [28,50; 35,41]	734,40 [732,11; 771,10]	246,88 [231,29; 257,61]
ПРП, n=43	7,96 [7,52; 8,23] $p < 0,001$	448,16 [417,81; 467,08] $p < 0,001$	1260,05 [1230,05; 1343,15] $p < 0,001$	555,12 [526,13; 580,04] $p < 0,001$
ПГЭ, n=52	4,53 [4,26; 4,94] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	355,14 [343,35; 375,66] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	1479,22 [1460,12; 1649,17] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	478,10 [470,16; 557,18] $p < 0,001$ $p_1 = 0,024$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_1 – достоверность разницы показателей у больных с отморожениями в динамике.

При исследовании изучаемых показателей у пострадавших в зависимости от массива криповреждения, выявлено, что у пациентов с криповреждением дистальных отделов стоп уровень MMP-2 в 2,1 раза выше относительно контроля ($p < 0,001$), у пациентов с отморожениями более проксимальных сегментов стопы – значение MMP-2 в 2,6 раза выше контрольных показателей ($p < 0,001$). Уровень MMP-2 у пострадавших с самыми тяжелыми отморожениями в 3,5 раза выше контрольных значений ($p < 0,001$) (Таблица 3.2). Уровень MMP-9 у пострадавших с отморожением пальцев стоп в 4,9 раза выше показателей контроля ($p < 0,001$), а у пациентов с более тяжелыми отморожениями – в 10 раз выше относительно

группы контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.2). У больных с отморожениями 3-й группы уровень MMP-9 увеличился в 14,5 раз относительно значений контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.2). У пациентов с криповреждением дистальных отделов стоп уровень TIMP-1 в крови в 2 раза выше относительно контроля ($p < 0,001$), у пациентов с отморожениями более проксимальных сегментов стопы – значение TIMP-1 в 1,8 раза выше контрольных показателей ($p < 0,001$). Уровень TIMP-1 у пострадавших с самыми тяжелыми отморожениями в 1,6 раза выше контрольных значений ($p < 0,001$) (Таблица 3.2). Уровень TIMP-2 у пострадавших с местной холодной травмой пальцев стоп в 2,1 раза выше показателей контроля ($p < 0,001$), у пациентов с более тяжелыми отморожениями – в 2,2 раз выше относительно группы контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.2). У больных с отморожениями 3-й группы уровень TIMP-2 в 2,3 раза превышает значения контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Содержание матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови у пациентов с отморожениями в зависимости от массива пораженных тканей (Me [Q1; Q3])

	MMP-2 (нг/мл)	MMP-9 (нг/мл)	TIMP-1 (нг/мл)	TIMP-2 (нг/мл)
Контроль, n = 30	2,30 [2,15; 2,47]	32,05 [28,50; 35,41]	734,40 [732,11; 771,10]	246,88 [231,29; 257,61]
1 группа, n = 35	4,64 [4,42; 4,81] $p < 0,001$	127,50 [126,01; 147,93] $p < 0,001$	1488,01 [1421,33; 1542,24] $p < 0,001$	512,11 [485,54; 530,17] $p < 0,001$
2 группа, n = 31	6,78 [6,72; 7,16] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	314,60 [304,56; 327,22] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	1294,99 [1250,02; 1355,15] $p < 0,001$ $p_1 = 0,159$	536,88 [495,24; 578,83] $p < 0,001$ $p_1 = 0,778$
3 группа, n = 29	7,98 [7,57; 8,21] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	448,84 [418,13; 466,57] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	1260,44 [1230,12; 1346,15] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,007$	555,12 [527,46; 579,94] $p < 0,001$ $p_1 = 0,013$ $p_2 = 0,021$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_1 – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных;

p_2 – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных.

У пострадавших с холодовой альтерацией наблюдается повышение концентрации металлопротеиназ и их ингибиторов в зависимости от объема поражения [25].

Таким образом, полученные в ходе исследования данные указывают на повышение содержания матричных металлопротеиназ и их ингибиторов сыворотке крови у пострадавших холодовой травмой в зависимости от объема пораженных тканей и сроков криповреждения.

3.2 Содержание молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) в системном кровотоке при отморожениях

У пострадавших в ранние сроки криповреждения в сыворотке крови по сравнению с группой контроля значительно повышались концентрации ICAM-1 в 22,6 раза ($p < 0,001$), VCAM-1 в 1,9 раза ($p = 0,111$) (Таблица 3.3).

В поздние сроки с момента отморожения содержание молекул адгезии (ICAM-1) оставалось в 6,3 раза ($p = 0,015$) выше контроля. Концентрация VCAM-1 не отличалась от контрольных значений. Максимальное содержание адгезивных молекул у пациентов наблюдалось в ранние сроки с самым тяжелым поражением тканей (Таблица 3.3).

В поздние сроки отморожения уровень исследуемых параметров превышает значения контроля. Вероятно, молекулы адгезии у пострадавших осуществляют компенсаторный механизм, способствующий обеспечению миграции лейкоцитов через эндотелий при воспалении и прибытии в очаг других клеток [48, 95].

Таблица 3.3 – Содержание молекул межклеточной адгезии в сыворотке крови у пациентов с отморожениями в разные периоды Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=30	ПРП, n=43	ПГЭ, n=52
ICAM-1 (нг/мл)	2,34 [1,70; 2,91]	54,03 [51,60; 62,24] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	14,78 [11,67; 20,89] $p < 0,001$ $p_1 = 0,015$ $p_2 = 0,0002$
VCAM-1 (нг/мл)	44,95 [37,36; 47,65]	85,60 [76,01; 94,75] $p_1 = 0,111$	55,18 [44,57; 65,28] $p_1 = 0,632$ $p_2 = 0,303$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_1 – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных;

p_2 – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных.

При изучении показателей ICAM-1 и VCAM-1 у пострадавших в зависимости от объема повреждения с отморожением дистальных сегментов стоп выявлено, что их уровень не изменился относительно контроля. (Таблица 3.4).

У пациентов с поражением всей стопы содержание ICAM-1 увеличилось в 2,9 раза ($p=0,02$), при этом значение VCAM-1 не изменялось относительно контроля (Таблица 3.4).

У пострадавших с криповреждением до уровня нижней трети голени уровень ICAM-1 – в 7,5 раз ($p<0,001$), значение VCAM-1 – в 2,4 раза ($p=0,005$) (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Содержание молекул межклеточной адгезии в сыворотке крови у пациентов с отморожениями в зависимости от массива пораженных тканей (Me Q1; Q3)

Показатель	Контроль n=30	1 группа, n=35	2 группа, n=31	3 группа, n=29
ICAM-1 (нг/мл)	2,34 [1,70; 2,91]	5,38 [4,47; 6,34] $p_1=0,11$	6,88 [6,12; 7,80] $p_1=0,02$ $p_2=0,453$	14,96 [12,60; 15,87] $p_1<0,001$ $p_2=0,005$ $p_3=0,025$
VCAM-1 (нг/мл)	44,95 [37,36; 47,65]	48,11 [33,85; 64,41] $p_1=0,903$	86,13 [79,03; 92,08] $p_1=0,05$ $p_2=0,16$	108,15 [99,63; 120,07] $p_1=0,005$ $p_2=0,031$ $p_3=0,236$

Примечание:

p_1 – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_2 – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных;

p_3 – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных.

Наблюдается зависимость между уровнем криповреждения и содержанием молекул межклеточной адгезии. В каждой последующей группе концентрация молекул повышается (Таблица 3.4) [26].

3.3 Активность в системе ПОЛ-АОС в системном кровотоке при местной холодовой травме

Результаты исследования активности в системе ПОЛ-АОС в системном кровотоке в патогенезе местной холодовой травмы классифицируются по периодам отморожения и по степени тяжести поражения. Повреждение тканей низкими температурами сопровождается изменением состояния ферментных систем, повреждением мембран клеток. После восстановления температуры тканей формируется зона некроза, активируется работа механизмов защиты.

В клетках вследствие холодовой ишемии образуются и накапливаются токсические конечные продукты анаэробного метаболизма, которые с восстановлением тканевой перфузии поступают в кровь. Известно, что наличие активных форм кислорода необходимо для поддержания адекватного функционирования клеточных мембран, очищению тканей от продуктов некроза, реализации механизмов защиты. Вместе с тем, чрезмерная активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран способна оказывать повреждающий эффект на различные субстраты живой клетки [65, 100, 103]. Кроме того, работа ферментных систем (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), в обычных условиях, инактивирующихся образующиеся свободные радикалы, после поражения холодом может проявлять функциональную несостоятельность.

Результаты исследования представлены в (Таблицы 3.5-3.14) в виде медианы, первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3). Поскольку в исследовании определено порядка 13 показателей, некоторые диаграммы выполнены в виде комбинированных графиков содержаний значений системы ПОЛ-АОС (Рисунки 3.7-3.16).

В результате исследований состояния системы ПОЛ-антиоксиданты у больных в разные периоды холодовой травмы было установлено, что в сыворотке крови больных с местной холодовой травмой III-IV степени возрастала концентрация начальных интермедиантов липопероксидации в изопропанольной

фазе. При этом у пациентов в раннем реактивном периоде отможенных уровень диеновых конъюгат повышался в 2,7 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 2,4 раза ($p < 0,001$), значение коэффициента E232/E220 уменьшалось в 2,6 раза ($p < 0,001$), а E278/E220 – в 2,4 раза ($p < 0,001$) (Таблица 3.5).

У пострадавших в позднем реактивном периоде концентрация первичных продуктов ПОЛ относительно предыдущего периода практически не менялась ($p_1 > 0,05$), причем превышала показатели контроля. Так, содержание диеновых конъюгат возрастало по сравнению с уровнем здоровых людей в 2,6 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 2,3 раза ($p < 0,01$), значение коэффициента E232/E220 снижалось в 2,6 раза ($p < 0,001$), а E278/E220 – в 2,4 раза ($p < 0,001$) (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Содержание первичных продуктов ПОЛ изопропанольной фазы у пострадавших с отможениями в разные периоды травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	РПП, n=30	РПП, n=40	ПГЭ, n=20
Диеновые конъюгаты	0,67 [0,63; 0,71]	1,83 [1,69; 1,97] $p < 0,001$	1,76 [1,59; 1,93] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	1,58 [1,43; 1,73] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$
Кетодиены и сопряженные триены	0,55 [0,52; 0,58]	1,31 [1,23; 1,39] $p < 0,001$	1,27 [1,09; 1,45] $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$	1,19 [1,08; 1,30] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$
E232/E220	1,07 [0,98; 1,16]	0,42 [0,39; 0,45] $p < 0,001$	0,40 [0,38; 0,42] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	0,39 [0,37; 0,41] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$
E278/E220	0,71 [0,68; 0,74]	0,29 [0,25; 0,35] $p < 0,001$	0,30 [0,28; 0,32] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	0,29 [0,27; 0,31] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно предыдущего периода.

Установлено, что у больных в периоде гранулирования и эпителизации местной холодовой травмы концентрация в крови диеновых конъюгат превышала контрольные данные в 2,4 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 2,2 раза ($p < 0,001$). Степень понижения коэффициентов E232/E220 и E278/E220 по сравнению с контролем оставалась на уровне позднего реактивного периода ($p < 0,001$). При этом регистрировалась минимальная разница параметров относительно предыдущего периода травмы ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.5).

В сыворотке крови пациентов с отморожениями отмечается резкое повышение концентрации диеновых конъюгат, кетодиенов и сопряженных триенов в РРП с постепенным снижением их в ПРП и ПГЭ. Значение коэффициентов E232/E220 и E278/E220 в указанные периоды резко снижалось и оставалось ниже показателей контроля.

Установлено, что в сыворотке крови больных с местной холодовой травмой III-IV степени в гептановой фазе также регистрировалось увеличение содержания первичных продуктов ПОЛ, причем разница относительно группы контроля выражалась значительно, чем в изопропанольной фазе. Так, у пациентов в раннем реактивном периоде отморожений уровень диеновых конъюгат возрастал в 22 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 3,6 раза ($p < 0,001$), при этом значение коэффициента E232/E220 не менялось, а E278/E220 – уменьшалось в 13 раз ($p < 0,001$) (Таблица 3.6).

У пострадавших в позднем реактивном периоде местной холодовой травмы концентрация первичных продуктов ПОЛ относительно предыдущего периода практически не менялась ($p_1 > 0,05$), причем превышала показатели группы контроля. Так, содержание диеновых конъюгат возрастало по сравнению с уровнем здоровых людей в 21 раз ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов

– в 4,3 раза ($p<0,01$), значение коэффициента E232/E220 не изменялось, а E278/E220 – уменьшалось в 10 раз ($p<0,001$) (Таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Содержание первичных продуктов ПОЛ гептановой фазы у пострадавших с отморожениями в разные периоды травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	ППП, n=30	ППП, n=40	ПГЭ, n=20
Диеновые конъюгаты	0,18 [0,15; 0,21]	3,92 [3,80; 4,04] $p<0,001$	3,75 [3,56; 3,94] $p<0,001$ $p_1>0,05$	3,52 [3,38; 3,66] $p<0,001$ $p_1>0,05$
Кетодиены и сопряженные триены	0,08 [0,06; 0,12]	0,29 [0,27; 0,31] $p<0,001$	0,34 [0,31; 0,37] $p<0,001$ $p_1>0,05$	0,27 [0,25; 0,29] $p<0,001$ $p_1>0,05$
E232/E220	0,92 [0,88; 0,96]	1,01 [0,95; 1,07] $p>0,05$	0,96 [0,89; 1,03] $p>0,05$ $p_1>0,05$	0,99 [0,98; 1,00] $p>0,05$ $p_1>0,05$
E278/E220	0,94 [0,91; 0,97]	0,07 [0,06; 0,08] $p<0,001$	0,09 [0,07; 0,11] $p<0,001$ $p_1>0,05$	0,07 [0,06; 0,08] $p<0,001$ $p_1>0,05$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_1 – достоверность разницы показателей относительно предыдущего периода.

Установлено, что у больных в периоде гранулирования и эпителизации местной холодовой травмы концентрация в крови диеновых конъюгатов превышала контрольные данные в 20 раз ($p<0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 3,4 раза ($p<0,001$). При этом изменения значения коэффициента E232/E220 не отмечалось, а уровень соотношения E278/E220 понижался в 13 раз ($p<0,001$).

Вместе с тем, регистрировалась минимальная разница параметров относительно предыдущего периода ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.6).

В сыворотке крови пациентов с отморожениями отмечается резкое повышение концентрации диеновых конъюгатов в РРП с постепенным снижением в ПРП и ПГЭ. Значение кетодиенов и сопряженных триенов повышается незначительно.

Концентрация коэффициента E232/E220 остается на уровне показателей контроля, а содержание коэффициента E278/E220 в указанные периоды резко снижается в раннем реактивном периоде и остается на низком уровне в последующие периоды.

Таблица 3.7 – Содержание ТБК-активных продуктов у больных с отморожениями в разные периоды травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	РРП, n=30	ПРП, n=40	ПГЭ, n=20
Эритроциты, мкмоль/мл липидов	55,81 [54,02; 59,13]	66,50 [62,01; 68,05] $p < 0,01$	67,83 [66,54; 69,17] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	66,3 [63,87; 68,72] $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$
Сыворотка мкмоль/мл липидов	2,01 [1,90; 2,14]	1,90 [1,87; 1,93] $p > 0,05$	1,90 [1,85; 1,97] $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	1,90 [1,83; 1,99] $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_1 – достоверность разницы показателей относительно предыдущего периода.

Установлено, что у больных с местной холодовой травмой конечностей в эритроцитах возрастало содержание промежуточных интермедиантов свободнорадикального окисления липидов, причем в сыворотке крови по сравнению с показателями здоровых людей отмечалась малозначимая разница ($p > 0,05$). Так, в раннем реактивном периоде в эритроцитах уровень ТБК-активных

продуктов возрастал относительно контроля на 19% ($p < 0,01$), в позднем реактивном периоде достигал максимума, на 22% превышая значения здоровых людей ($p < 0,001$), а в последующем периоде был на 18% выше показателей контрольной группы ($p < 0,05$). При этом не наблюдалось разницы параметров вторичных продуктов ПОЛ между группами клинического течения отморожений ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.7).

У пациентов с отморожениями в эритроцитах отмечается повышение содержание промежуточных интермедиантов свободнорадикального окисления липидов, а в сыворотке крови практически не менялось во все периоды криотравмы.

У всех пострадавших с отморожениями каталазная активность в эритроцитах снижалась, а в сыворотке крови не менялась. При этом в раннем реактивном периоде холодовой травмы падение каталазной активности в эритроцитах проявлялось в наибольшей степени - на 12% ($p < 0,001$), в позднем реактивном периоде таковая снижалась относительно группы контроля на 10% ($p < 0,001$), а в периоде гранулирования и эпителизации – на 7% ($p < 0,05$). Не регистрировалось значимых колебаний активности каталазы в эритроцитах и сыворотке крови при сопоставлении результатов исследования между группами клинического течения ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Каталазная активность у больных с отморожениями в разные периоды травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	РРП, n=30	ПРП, n=40	ПГЭ, n=20
Эритроциты, нмоль/с×мг белка	13,15 [12,88; 13,42]	11,72 [11,60; 11,84] $p < 0,001$	11,94 [11,79; 12,09] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	12,26 [12,01; 12,51] $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$
Сыворотка, нмоль/с×мг белка	1,85 [1,78; 1,99]	1,99 [1,93; 2,05] $p > 0,05$	2,01 [1,94; 2,08] $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	2,03 [1,91; 2,15] $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно предыдущего периода.

Установлено, что динамики общей антиоксидантной активности сыворотки крови у больных с местной холодовой травмой относительно здоровых людей не отмечалось ($p > 0,05$). Одновременно не регистрировалось значимых изменений указанного показателя при сопоставлении результатов исследования больных с отморожениями конечностей в различные периоды течения патологии ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Общая антиоксидантная активность сыворотки у больных с отморожениями в разные периоды местной холодовой травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	РРП, n=30	РРП, n=40	ПГЭ, n=20
Общая антиоксидантная активность, %	12,46 [11,67; 13,00]	11,36 [10,74; 11,98] p>0,05	11,72 [11,28; 12,16] p>0,05 p ₁ >0,05	12,02 [10,98; 13,06] p>0,05 p ₁ >0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно предыдущего периода.

Таким образом, холодное воздействие на ткани и последующие изменения состояния систем микроциркуляции, свертывания крови и фибринолиза, иммунитета – сопровождалось обеднением нутритивного кровотока с развитием гипоксии. Соответственно, в крови пациентов повышался уровень начальных интермедиантов липопероксидации, достигая максимума в раннем реактивном периоде. Тем не менее, у большинства пострадавших от воздействия низких температур наблюдаемые изменения состояния в системе ПОЛ-антиоксиданты не выглядели фатальными. Несмотря на повышение содержания вторичных продуктов ПОЛ и возрастание каталазной активности в эритроцитах, в сыворотке пациентов не регистрировалось значимых отклонений исследуемых параметров.

Также не наблюдалось серьезных сдвигов общей окислительной активности сыворотки крови. Следовательно, «окислительный стресс» у больных с местной холодовой травмой проявлялся менее значимо относительно пациентов с тяжелыми термомеханическими повреждениями или критическими изменениями жизненноважных органов [24, 35]. Однако сдвиги в системе ПОЛ-антиоксиданты, несомненно, являются неотъемлемыми звеньями патогенеза развития некроза тканей и течения раневого процесса при глубоких отморожениях.

При изучении исследуемых показателей у пациентов в зависимости от объема пораженных холодом тканей, выявлено, что в сыворотке крови больных с отморожением III-IV степени только пальцев конечностей регистрировалось повышение содержания начальных интермедиантов липопероксидации изопропанольной фазы относительно контроля. Так, уровень диеновых конъюгат повышался в 2,2 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 2,1 раза ($p < 0,001$), причем значение коэффициента E232/E220 уменьшалось в 2,4 раза ($p < 0,001$), а E278/E220 – в 2,2 раза ($p < 0,001$) (Таблица 3.10).

У пострадавших с отморожениями 2-й группы отмечались более значительные отклонения содержания первичных продуктов ПОЛ. Уровень диеновых конъюгат превышал значения здоровых людей в 2,4 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 2,3 раза ($p < 0,001$), при этом значение коэффициента E232/E220 падало в 2,7 раза ($p < 0,001$), а E278/E220 – в 2,4 раза ($p < 0,001$). Вместе с тем, по сравнению с результатами группы пациентов с минимальной тяжестью травмы значимых изменений исследуемых параметров не регистрировалось ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.10).

Установлено, что у больных с наибольшим массивом пораженных действием низких температур тканей концентрация в крови диеновых конъюгат в изопропанольной фазе превышала контрольные данные в 2,9 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 2,4 раза ($p < 0,001$). При этом значение коэффициента E232/E220 уменьшалось в 3 раза ($p < 0,001$), а E278/E220 – в 2,6 раза ($p < 0,001$). Относительно показателей пациентов 1-й группы регистрировалось увеличение содержания диеновых конъюгат в 1,3 раза ($p_1 < 0,05$), а кетодиенов и

сопряженных триенов – в 1,2 раза ($p_1 < 0,05$), кроме того, значение коэффициентов E232/E220 и E278/E220 уменьшалось в 1,2 раза ($p_1 < 0,05$) (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Содержание первичных продуктов ПОЛ изопропанольной фазы у пострадавших с различной тяжестью местной холодовой травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	1 группа, n=36	2 группа, n=29	3 группа, n=25
Диеновые конъюгаты	0,67 [0,63; 0,71]	1,49 [1,36; 1,62] $p < 0,001$	1,64 [1,51; 1,78] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	1,92 [1,81; 2,03] $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
Кетодиены и сопряженные триены	0,55 [0,52; 0,58]	1,13 [1,07; 1,19] $p < 0,001$	1,24 [1,15; 1,33] $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$	1,33 [1,26; 1,42] $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
E232/E220	1,07 [0,98; 1,16]	0,44 [0,41; 0,47] $p < 0,001$	0,40 [0,38; 0,43] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	0,36 [0,34; 0,39] $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
E278/E220	0,71 [0,68; 0,74]	0,33 [0,31; 0,35] $p < 0,001$	0,29 [0,27; 0,31] $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	0,27 [0,25; 0,29] $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p_1 – достоверность разницы показателей относительно больных 1-й группы.

У больных с минимальным массивом пораженных холодом тканей в сыворотке крови больных регистрировалось повышение содержания первичных продуктов ПОЛ гептановой фазы относительно здоровых людей. Так, уровень диеновых конъюгатов повышался в 20 раз ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 3,5 раза ($p < 0,001$), значение коэффициента E232/E220 не менялось ($p > 0,05$), а E278/E220 – уменьшалось в 11,8 раза ($p < 0,001$) (Таблица 3.11).

У пациентов с местной холодовой травмой 2-й группы отмечалось увеличение содержания диеновых конъюгат относительно контроля в 21 раз ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 3,6 раза ($p < 0,001$), при этом значение коэффициента E232/E220 не изменялось ($p > 0,05$), а E278/E220 – уменьшалось в 11,8 раза ($p < 0,001$). Вместе с тем, по сравнению с результатами группы пострадавших с поражением только пальцев конечностей значимых изменений исследуемых параметров не регистрировалось ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.11).

Установлено, что у больных с наибольшим массивом пораженных действием низких температур тканей содержание в крови в гептановой фазе диеновых конъюгат возрастало по сравнению с контрольными данными в 23 раза ($p < 0,001$), кетодиенов и сопряженных триенов – в 4,1 раза ($p < 0,001$). При этом отклонений значения коэффициента E232/E220 не отмечалось ($p > 0,05$), а отношение E278/E220 – уменьшалось в 13,4 раза ($p < 0,001$).

По сравнению с исследованными показателями пациентов 1-й группы у пострадавших с максимальной тяжестью местной холодовой травмы регистрировалось увеличение содержания диеновых конъюгат на 14% ($p_1 < 0,05$), а кетодиенов и сопряженных триенов – на 18% ($p_1 < 0,05$). Разницы значений коэффициентов E232/E220 и E278/E220 не наблюдалось ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.11).

Установлено, что у больных с местной холодовой травмой III-IV степени только пальцев конечностей в эритроцитах относительно здоровых людей возрастал уровень ТБК-активных продуктов на 19% ($p < 0,01$). У пациентов 2-й группы содержание промежуточных интермедиантов свободнорадикального окисления липидов относительно контроля увеличивалось на 20% ($p < 0,001$), причем по сравнению с параметрами пострадавших с минимальным объемом поражения отклонений не регистрировалось ($p_1 > 0,05$) (Таблица 3.12).

Таблица 3.11 – Содержание первичных продуктов ПОЛ гептановой фазы у пострадавших с различной тяжестью местной холодовой травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	1 группа, n=36	2 группа, n=29	3 группа, n=25
Диеновые конъюгаты	0,18 [0,15; 0,21]	3,58 [3,45; 3,71] p<0,001	3,78 [3,57; 3,99] p<0,001 p ₁ >0,05	4,09 [3,92; 4,26] p<0,001 p ₁ <0,05
Кетодиены и сопряженные триены	0,08 [0,06; 0,12]	0,28 [0,26; 0,29] p<0,001	0,29 [0,26; 0,32] p<0,001 p ₁ >0,05	0,33 [0,31; 0,35] p<0,001 p ₁ <0,05
E232/E220	0,92 [0,88; 0,96]	1,01 [0,98; 1,04] p>0,05	0,99 [0,96; 1,02] p>0,05 p ₁ >0,05	0,97 [0,95; 0,99] p>0,05 p ₁ >0,05
E278/E220	0,94 [0,91; 0,97]	0,08 [0,06; 0,10] p<0,001	0,08 [0,07; 0,09] p<0,001 p ₁ >0,05	0,07 [0,06; 0,08] p<0,001 p ₁ >0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно больных 1-й группы.

У больных с максимальным массивом поврежденных действием низких температур тканей в эритроцитах концентрация ТБК-активных продуктов увеличивалась относительно здоровых людей на 23% (p<0,001). При этом по сравнению с показателями пострадавших с отморожениями пальцев конечностей уровень вторичных продуктов ПОЛ возрастал на 3% (p₁<0,05) (Таблица 3.12).

У обследованных пациентов с отморожениями по сравнению с показателями здоровых людей отмечалась малозначимая разница содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови (p>0,05). Также не регистрировалось отклонений параметров между группами по тяжести местной холодовой травмы (p₁>0,05) (Таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Содержание ТБК-активных продуктов у пострадавших с различной тяжестью местной холодовой травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	1 группа, n=36	2 группа, n=29	3 группа, n=25
Эритроциты, мкмоль/мл липидов	55,81 [54,02; 59,13]	66,82 [66,33; 67,34] p<0,01	67,12 [66,42; 67,83] p<0,001 p ₁ >0,05	68,64 [68,02; 69,22] p<0,001 p ₁ <0,05
Сыворотка мкмоль/мл липидов	2,01 [1,90; 2,14]	1,93 [1,90; 1,96] p>0,05	1,90 [1,86; 1,95] p>0,05 p ₁ >0,05	1,95 [1,90; 2,01] p>0,05 p ₁ >0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно больных 1-й группы.

У больных всех групп, разделенных по тяжести поражений тканей холодом, относительно контроля каталазная активность в эритроцитах уменьшалась, а в сыворотке не менялась. При этом у пациентов с отморожениями пальцев конечностей снижение каталазной активности в эритроцитах по сравнению с данными здоровых людей составляло 11% (p<0,001), у больных 2-й группы - 12% (p<0,001), а у пострадавших с наибольшим массивом поврежденных холодом тканей – на 14% (p<0,001). Кроме того, при сопоставлении результатов исследования больных 3-й группы относительно 1-й регистрировалось падение каталазной активности в эритроцитах на 3% (p₁<0,05) (Таблица 3.13).

Установлено, что изменений общей антиоксидантной активности сыворотки крови у больных с различной тяжестью местной холодовой травмы относительно здоровых людей не отмечалось (p>0,05). Кроме того, не наблюдалось значимых отклонений данного показателя при сопоставлении результатов исследования больных с отморожениями конечностей с различным массивом пораженных действием низких температур тканей (p₁>0,05) (Таблица 3.14).

Таблица 3.13 – Каталазная активность у пострадавших с различной тяжестью местной холодовой травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	1 группа, n=36	2 группа, n=29	3 группа, n=25
Эритроциты, нмоль/с*мг белка	13,15 [12,88; 13,42]	11,86 [11,74; 11,98] p<0,001	11,71 [11,61; 11,81] p<0,001 p ₁ >0,05	11,54 [11,46; 11,64] p<0,001 p ₁ <0,05
Сыворотка, нмоль/с*мг белка	1,85 [1,78; 1,99]	2,01 [1,95; 2,07] p>0,05	2,07 [1,98; 2,14] p>0,05 p ₁ >0,05	1,97 [1,91; 2,03] p>0,05 p ₁ >0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно больных 1-й группы.

Таблица 3.14 – Общая антиоксидантная активность сыворотки у пострадавших с различной тяжестью местной холодовой травмы Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=20	1 группа, n=36	2 группа, n=29	3 группа, n=25
Общая антиоксидантная активность, %	12,46 [11,67; 13,00]	11,64 [11,17; 12,11] p>0,05	11,51 [11,15; 11,87] p>0,05 p ₁ >0,05	11,30 [11,04; 11,56] p>0,05 p ₁ >0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей относительно больных 1-й группы.

Таким образом, при увеличении массива пораженных действием низких температур тканей в крови пострадавших возросло содержание первичных продуктов ПОЛ, а также уровень промежуточных интермедиантов свободнорадикального окисления липидов в эритроцитах. При этом в красных кровяных тельцах снижалась активность каталазы. Указанные изменения отражали степень постгипоксических изменений в результате действия холода, а также нарушений кровообращения и тканевого обмена на фоне развития

воспалительной реакции, сдвигов секреции эндотелиальными клетками вазоактивных молекул, выделения прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических факторов. Кроме того, холодовая альтерация и последующие изменения гомеостаза оказывали влияние на состояние ферментных систем в зоне поражения. Уровень функциональной состоятельности последних, в свою очередь, обуславливал течение раневого процесса и работу механизмов защиты при отморожениях.

Вместе с тем, каталазная и общая антиоксидантная активность в сыворотке крови пострадавших с отморожениями не претерпевали значимых изменений. Вероятно, у больных с различной тяжестью течения холодовой травмы состояние в системе ПОЛ-антиоксиданты не выходило за рамки компенсации. Это связано с относительно небольшим по объему очагу альтерации тканей, своевременностью выполнения хирургических вмешательств по удалению нежизнеспособных тканей, а также с особенностями повреждения холодом, сопровождающимися уменьшением уровня обменных процессов в тканях.

3.4 Морфологические особенности изменения тканей при отморожениях

При холодовом воздействии в тканях развиваются тяжелые дистрофические и некротические изменения. Это в свою очередь приводит к морфофункциональным сдвигам, от незначительных, обратимых нарушений в ранние сроки после травмы, вплоть до развития гангрены [6, 20, 21].

При патоморфологическом изучении кожи в поздние сроки отмечался выраженный гиперкератоз, паракератоз, акантоз многослойного плоского ороговевающего эпителия (роговая дистрофия) (Рисунок 3.1), который обусловлен длительным воспалением в зоне холодной альтерации. Наблюдалось отслоение рогового слоя и наличием под ним слоя фибрина с примесью полиморфноядерных лейкоцитов, эритроцитов (Рисунок 3.2). В клетках эпидермиса наблюдалась гибель ядер по типу карипикноза и карiorексиса.

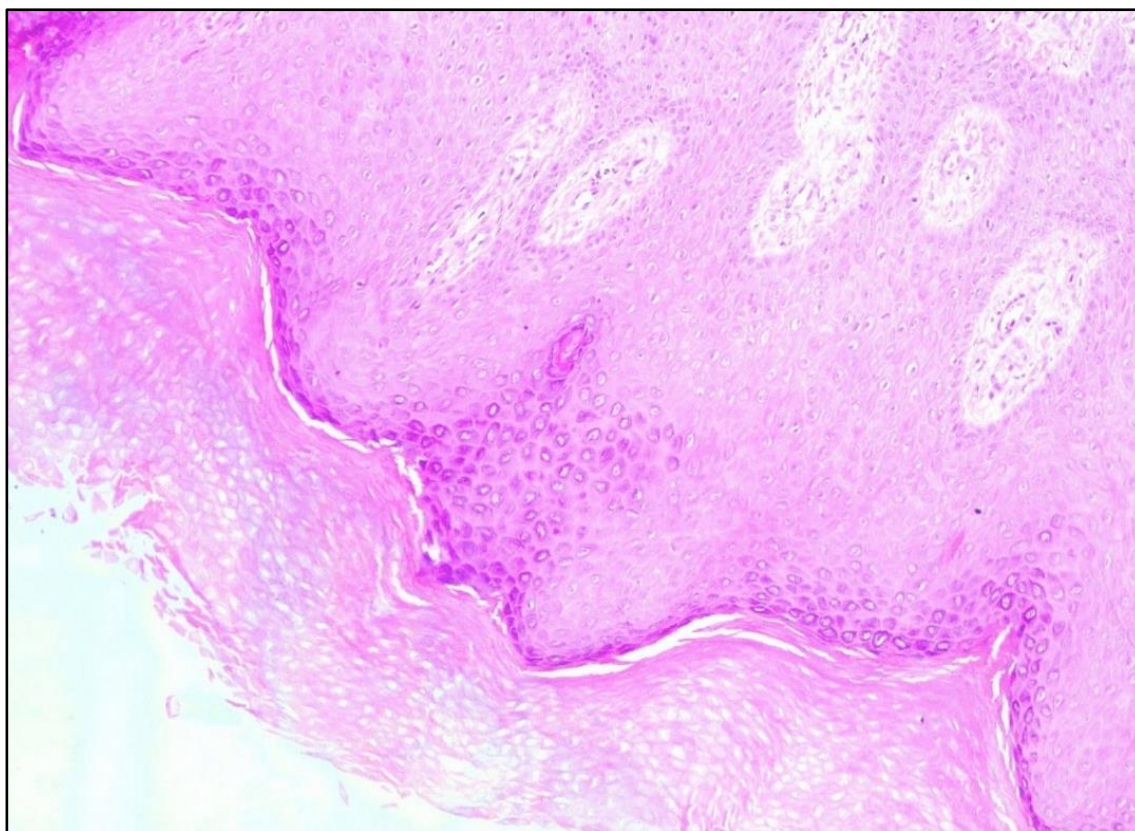


Рисунок 3.1 – Выраженный гиперкератоз, паракератоз, акантоз многослойного плоского ороговевающего эпителия. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодовой травмы. Фото автора

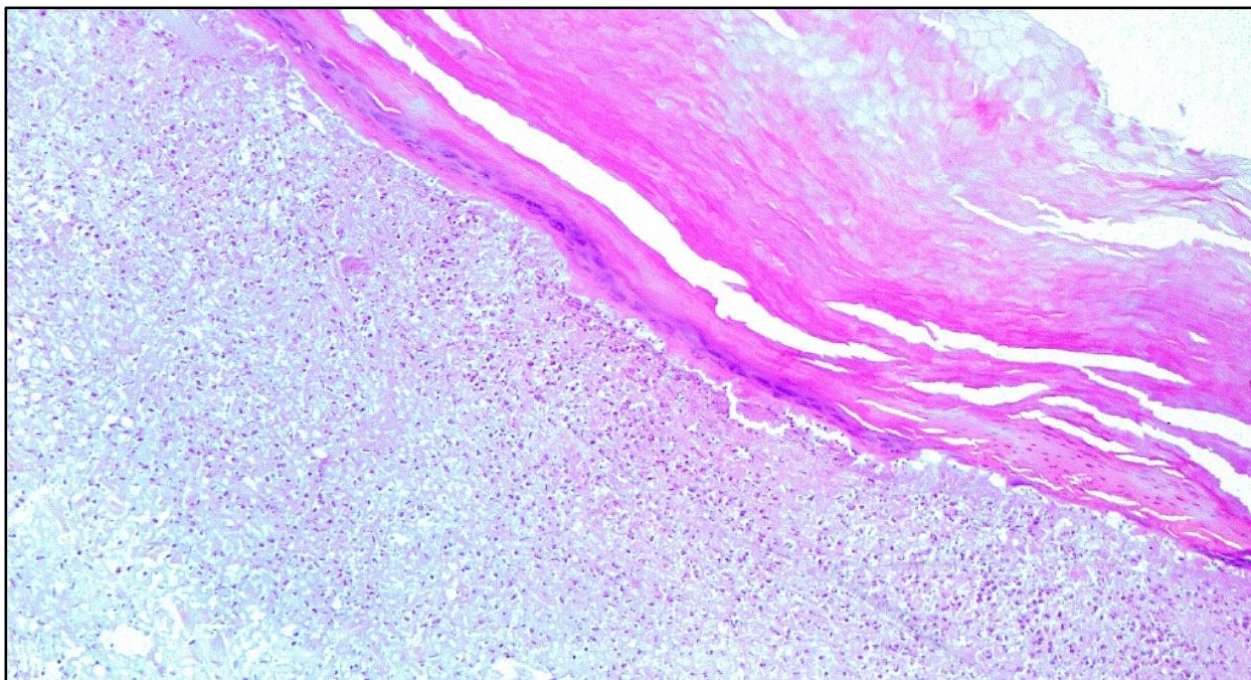


Рисунок 3.2 – Отслоение рогового слоя и наличием под ним слоя фибрина с примесью полиморфноядерных лейкоцитов. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодовой травмы. Фото автора

Дерма с тяжелыми циркуляторными нарушениями: отеком, полнокровными, тромбированными и паретически расширенными сосудами, обширными кровоизлияниями, гнойными флебитами, тромбофлебитами. Однако с сохраненным строением или умеренными дистрофическими изменениями кожных дериватов: сальных, потовых желез, эпителия волосяных влагалищ (Рисунок 3.3).

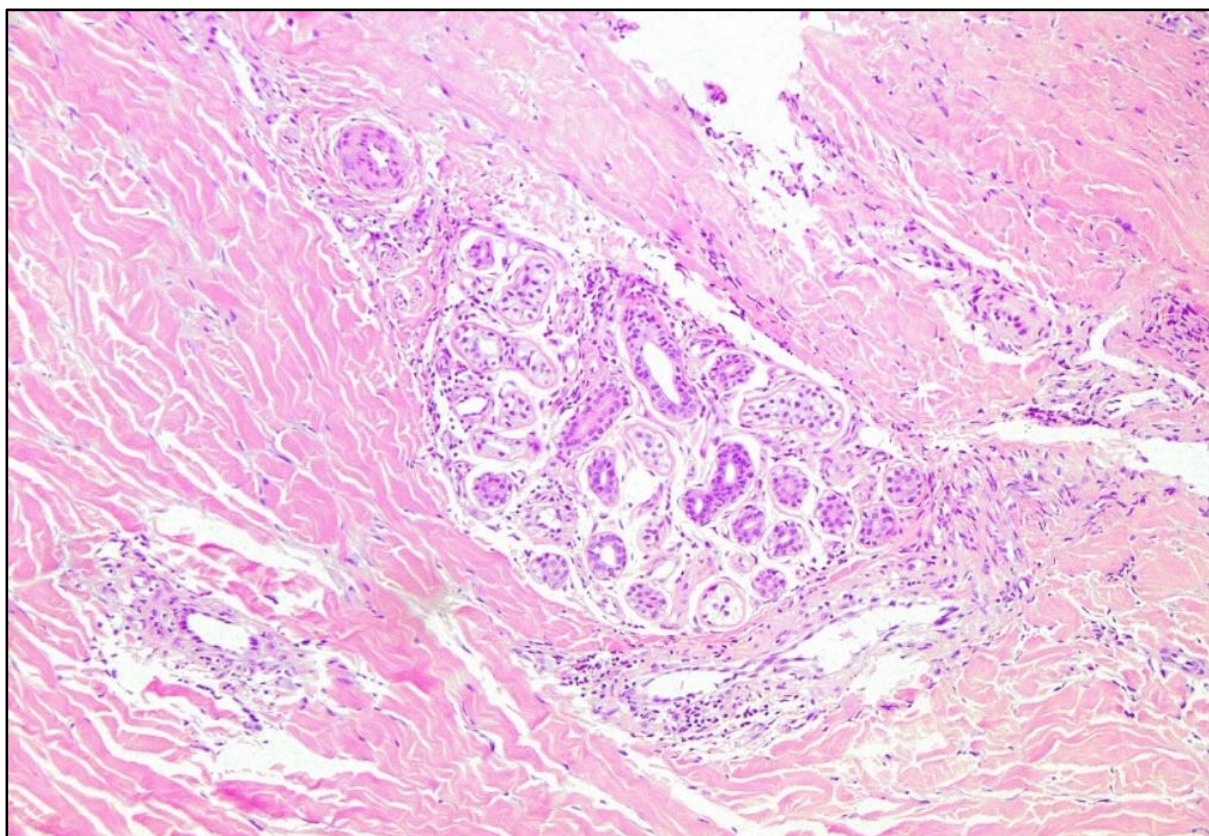


Рисунок 3.3 – Дерма с сохраненным строением и умеренными дистрофическими изменениями кожных дериватов: сальных, потовых желез. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодной травмы. Фото автора

Волокна поперечнополосатой и гладкой мышечной ткани в виде гомогенных лент, построенных из клеток миоцитов с эозинофильной цитоплазмой, отсутствием в части из них ядер, исчезновением поперечной исчерченности волокон. В некоторых клетках имелось несколько ядер, что говорит о регенерации мышечной ткани. Отмечался межмышечный и межклеточный отек. На отдельных участках густая, расслаивающаяся, диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация, представленная скоплением большого количества полиморфно-ядерных лейкоцитов с примесью фибрина, эритроцитов (Рисунок 3.4). Наблюдались явления регенерации в виде скопления мышечных ядер, а также замещение мышечной ткани соединительной, с очагами дистрофического обызвествления, что так же указывает на длительно текущие воспалительные процессы в тканях.

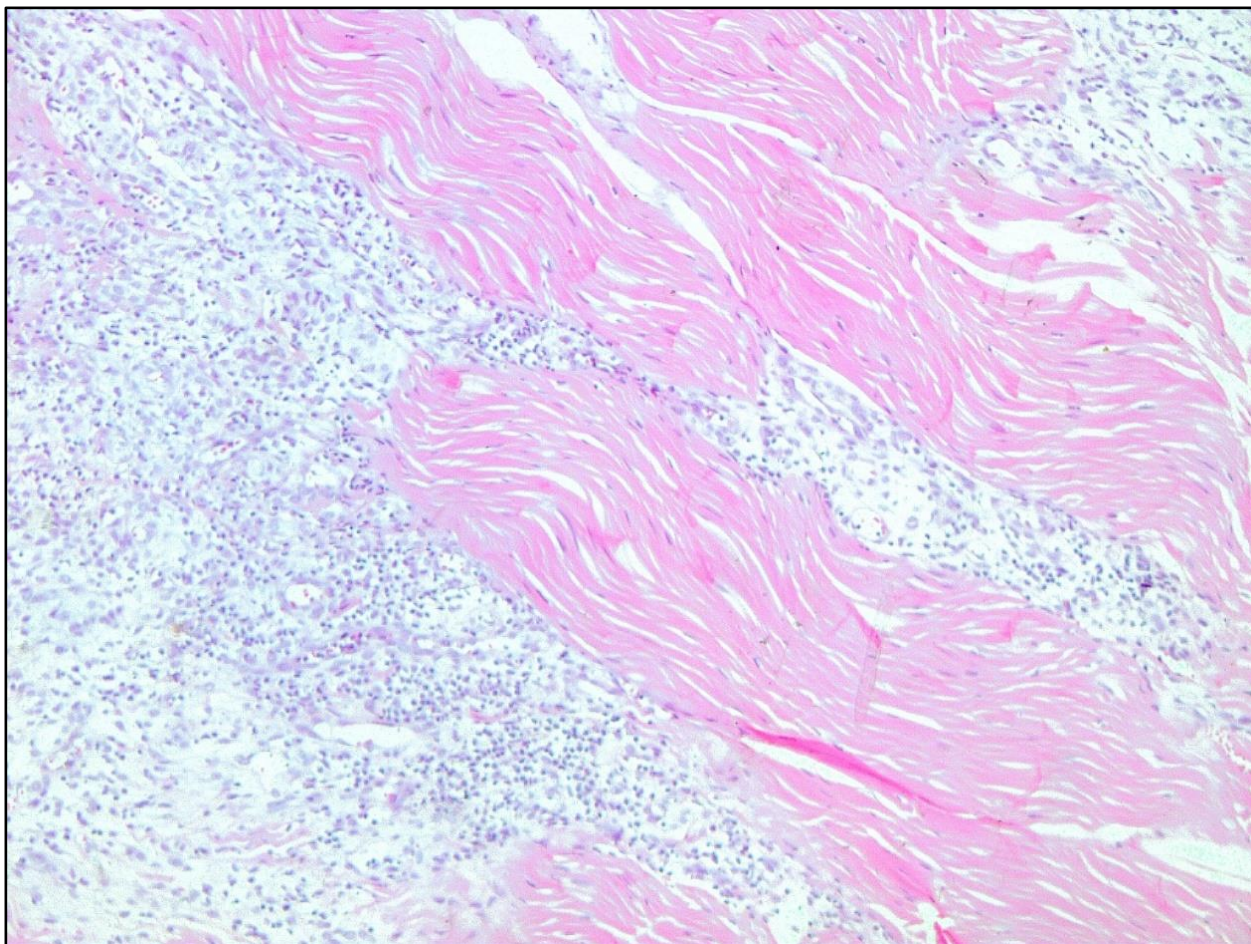


Рисунок 3.4 – Волокна поперечнополосатой мышечной ткани в виде гомогенных лент с исчезновением поперечной исчерченности волокон и расслаивающей, диффузно-очаговой воспалительной инфильтрацией. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодовой травмы. Фото автора

Выраженным изменениям при холодовой травме были подвержены кровеносные сосуды, что доказывает их высокую чувствительность к низким температурам. И именно сосудистые поражения являются причиной вторичных изменений в тканях зоны криодеструкции. Так, при изучении гистологических препаратов отмечалось утолщение стенок артерий за счет гипертрофии мышечной оболочки и эластических волокон, разрастание соединительной ткани, сужение просвета, вплоть до полной облитерации его (Рисунок 3.5). Наряду с этим, наблюдалось резкое расширение сосудов, очаговая периваскулярная инфильтрация, представленная лимфоцитами, полиморфноядерными лейкоцитами. В просвете сосудов распространенные тромбозы, представленные

красными, гиалиновыми тромбами с явлениями организации, реканализации (Рисунок 3.6). Стенки вен так же утолщены за счет разрастания эндотелия и врастания соединительной ткани в мышечную оболочку. Просвет выполнен красными тромбами.

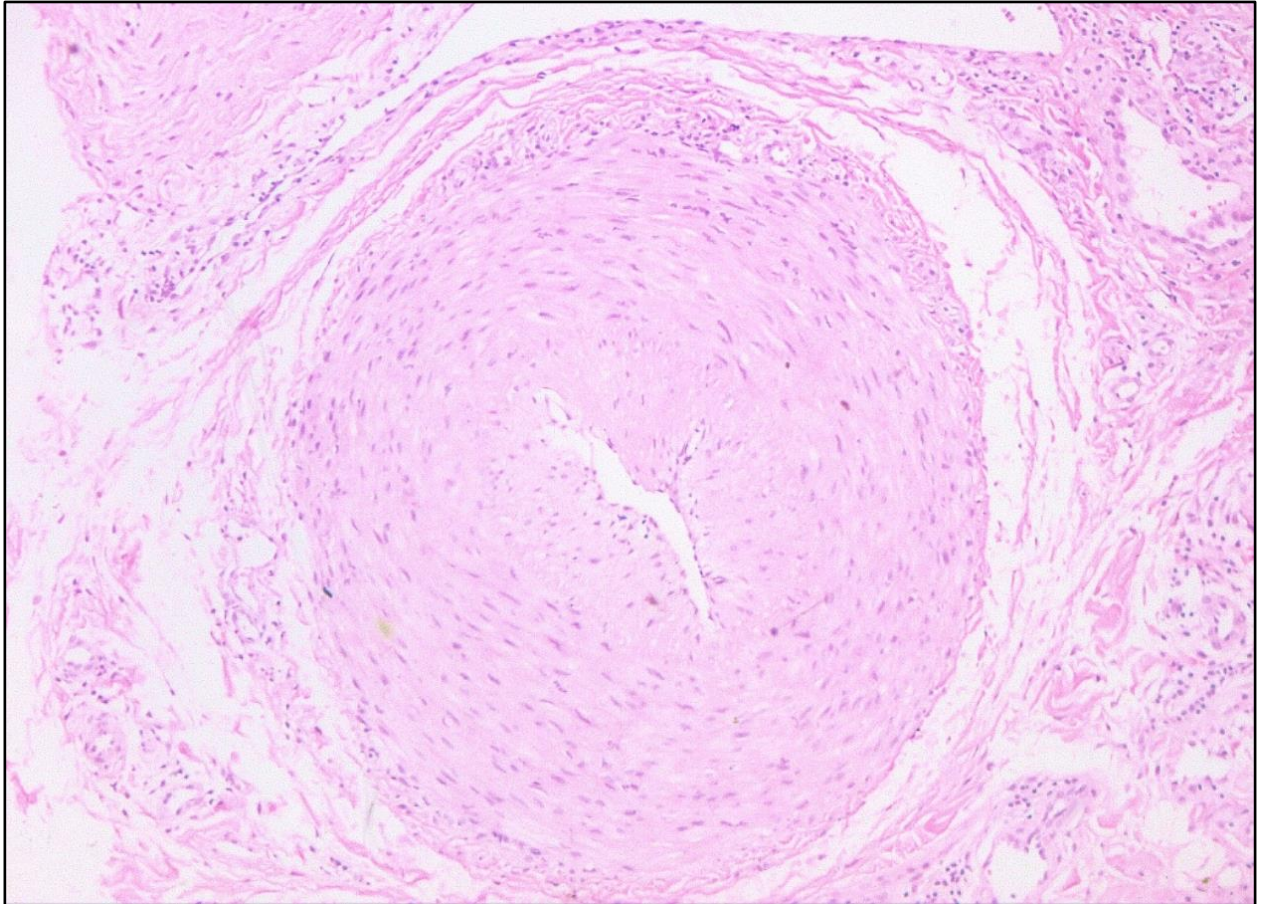


Рисунок 3.5 – Утолщение стенок артерий за счет гипертрофии мышечной оболочки и эластических волокон, разрастание соединительной ткани, резкое сужение просвета сосуда. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодовой травмы. Фото автора

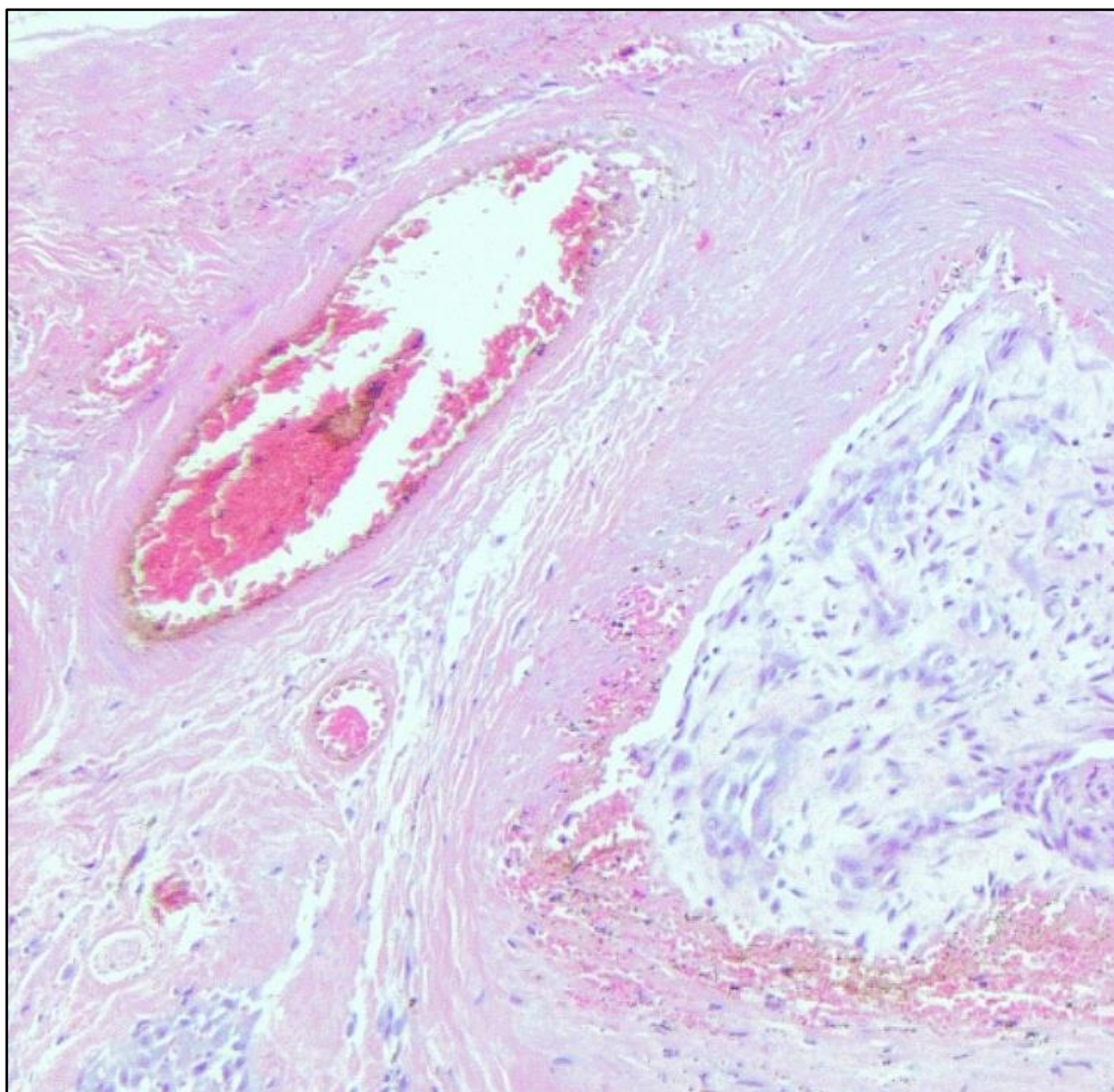


Рисунок 3.6 – В просвете сосудов распространенные тромбозы, представленные красными, гиалиновыми тромбами. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодовой травмы. Фото автора

При изучении периферических нервов кожи и мягких тканей отмечались минимальные дистрофические изменения, представленные скоплением лейкоцитов в эндоневрии, периневрии, а также в окружающей нервной ствол ткани (Рисунок 3.7).

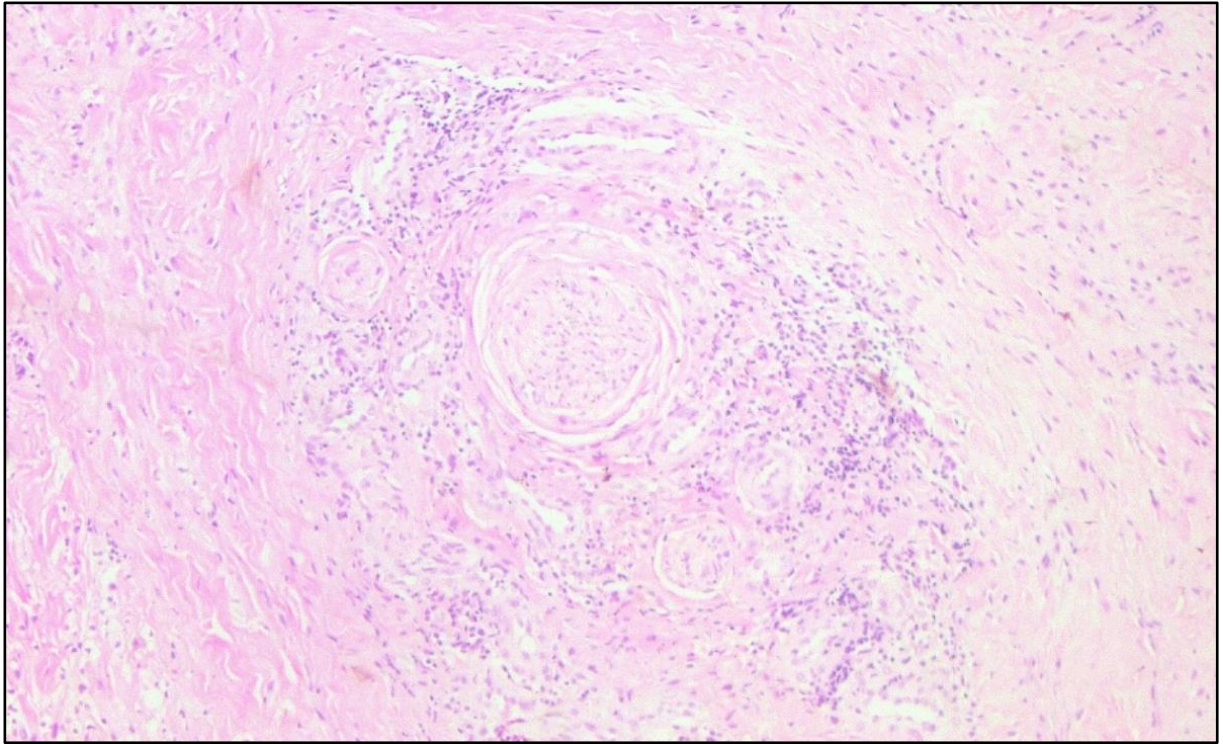


Рисунок 3.7 – Скопление лейкоцитов в эндо, периневрии, а также в окружающей нервный ствол жировой ткани. Отморожение III-IV степени. Зона демаркации, 30 сутки с момента холодовой травмы. Фото автора

3.5 Морфометрические исследования толщины коллагеновых волокон при отморожениях

Морфометрические исследования по определению толщины коллагеновых волокон выполнены для группы контроля и пациентов с отморожениями на 30-е сутки при местной холодовой травме. В комплекс морфометрических исследований дополнительно включен компьютерный анализ микрофотографий. Результаты исследования представлены в таблицах 3.15 и 3.16 в виде медианы, первого и третьего квартилей $Me (Q1; Q3)$. Оформление результатов выполнено в виде боксплотов толщины коллагеновых волокон и значений стандартных отклонений KK в исследуемой области микрофотографии для групп (Контроль, Больные) на рисунках 3.24-3.25. Изображение результатов компьютерного анализа микрофотографий представлено в формате классифицированных изображений по классам: Контроль → Переходный класс → Больные на рисунках 3.26-3.27.

При анализе полученных данных выявлено значительное увеличение толщины коллагеновых волокон у группы больных относительно группы контроля в поздние сроки криоповреждения. Этот факт подтверждает значительное повреждение тканей зоны отморожения в поздние сроки. А именно приводит к деструктивным процессам в коллагеновых волокнах, что проявляется в виде изменения их толщины и ориентации. Происходит так называемая дезорганизация ЭЦМ, компонентами которого являются коллагеновые волокна.

Дезорганизация коллагена имеет ферментативные и неферментативные механизмы. Ферментативные механизмы осуществляются взаимодействием коллагеназ и их ингибиторов, обеспечивающих регуляцию интенсивности катаболических процессов. Неферментативные механизмы связаны с образованием дополнительных межмолекулярных связей под действием конечных продуктов гликирования ультрафиолетового облучения или механического давления (отек), а также в результате канцерогенеза. Различные регуляторные пути и механизмы деградации пересекаются друг с другом на

разных этапах, а не работают независимо друг от друга [160]. Эти данные подтверждаются нашими исследованиями и доказывают, что повышенный уровень матричных металлопротеиназ и их ингибиторов, а также вторичные дистрофические и воспалительные изменения в тканях приводят к повреждению коллагеновых волокон и их дезорганизации. Данный феномен патогенетически обосновывает большое количество поздних осложнений у пациентов с МХТ и затяжное течение репаративных процессов.

На рисунке 3.24 показан пример результатов определения толщины коллагеновых волокон для микрофотографий из группы контроля и группы больных. В поле зрения микрофотографии наблюдается существенные различия в виде изменения толщины и ориентации коллагеновых волокон зоны криповреждения.

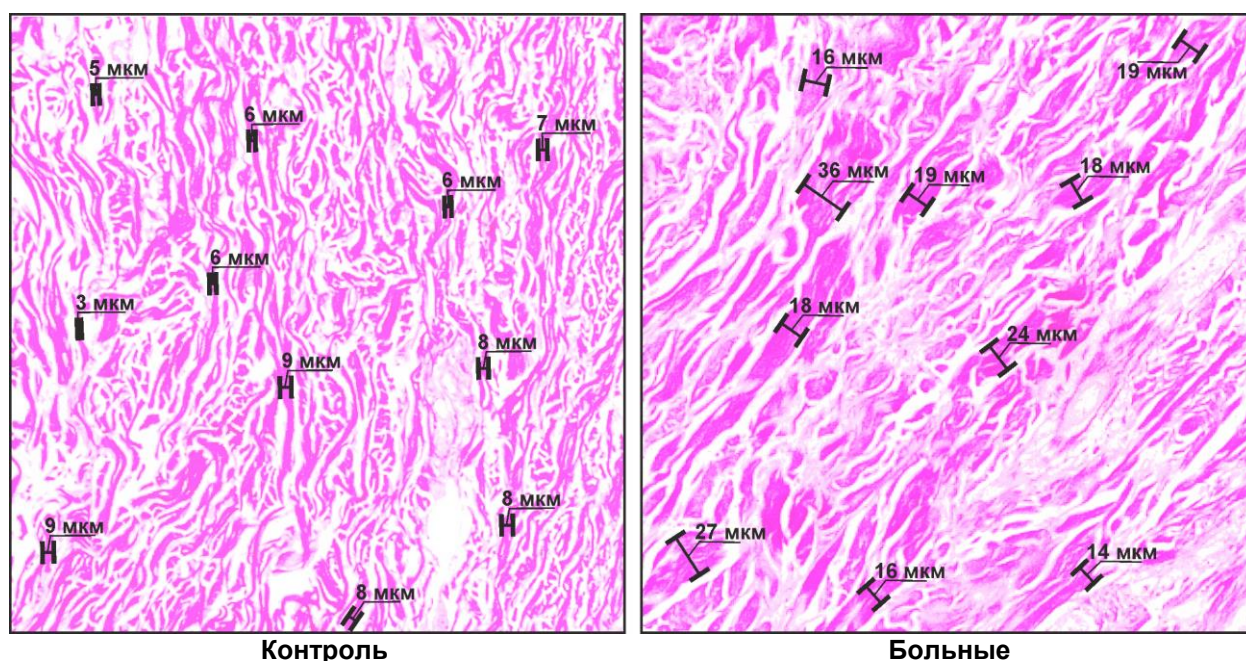


Рисунок 3.8 – Толщина коллагеновых волокон у группы контроля и больных при отморожениях. Окраска пикрофуксином по Ван Гизону. Увеличение 5X. Фото автора

В позднем реактивном периоде у пациентов с криповреждением толщина волокон в 2,8 раза выше относительно контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Толщина коллагеновых волокон у больных при местной
холодовой травме Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=50	Больные, n=84
Толщина волокон, мкм	6,40 [5,12; 7,68]	17,92 [14,72; 23,04] p<0,001

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля.

В результате компьютерного анализа снимков коллагеновых волокон для группы контроля и группы больных определено стандартное отклонение коэффициента кривизны в исследуемой области микрофотографии.

В позднем реактивном периоде у пациентов с криповреждением стандартное отклонение КК в исследуемой области микрофотографии в 1,8 раза ниже относительно группы контроля (p<0,001) (Таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Значение стандартного отклонения КК в исследуемой
области микрофотографии при местной холодовой травме Me [Q1; Q3]

Показатель	Контроль, n=50	Больные, n=84
Стандартное отклонение КК в исследуемой области микрофотографии, усл. ед	952 [750; 1152]	527 [420; 648] p<0,001

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля.

При значительном криповреждении тканей происходят изменения длины, толщины и ориентации коллагеновых волокон, что хорошо сопоставляется в поле зрения микрофотографии. В этой связи, изменение текстуры микрофотографии, приводит к изменению численных характеристиках стандартного отклонения КК в исследуемой области. Это подтверждается сильной обратной корреляционной связью между измеренной толщиной коллагеновых волокон и показателем

стандартного отклонение КК в исследуемой области микрофотографии (-0,75; $p < 0,001$).

Таким образом, характеристика стандартного отклонения КК позволяет отнести ту или иную микрофотографию к числу имеющих патологические признаки, либо к образцу здоровых тканей. Этот факт позволяет на основе полученных статистических показателей стандартного отклонения КК классифицировать область исследования микрофотографии по классам: Контроль → Переходный класс → Больные (Рисунок 3.9).

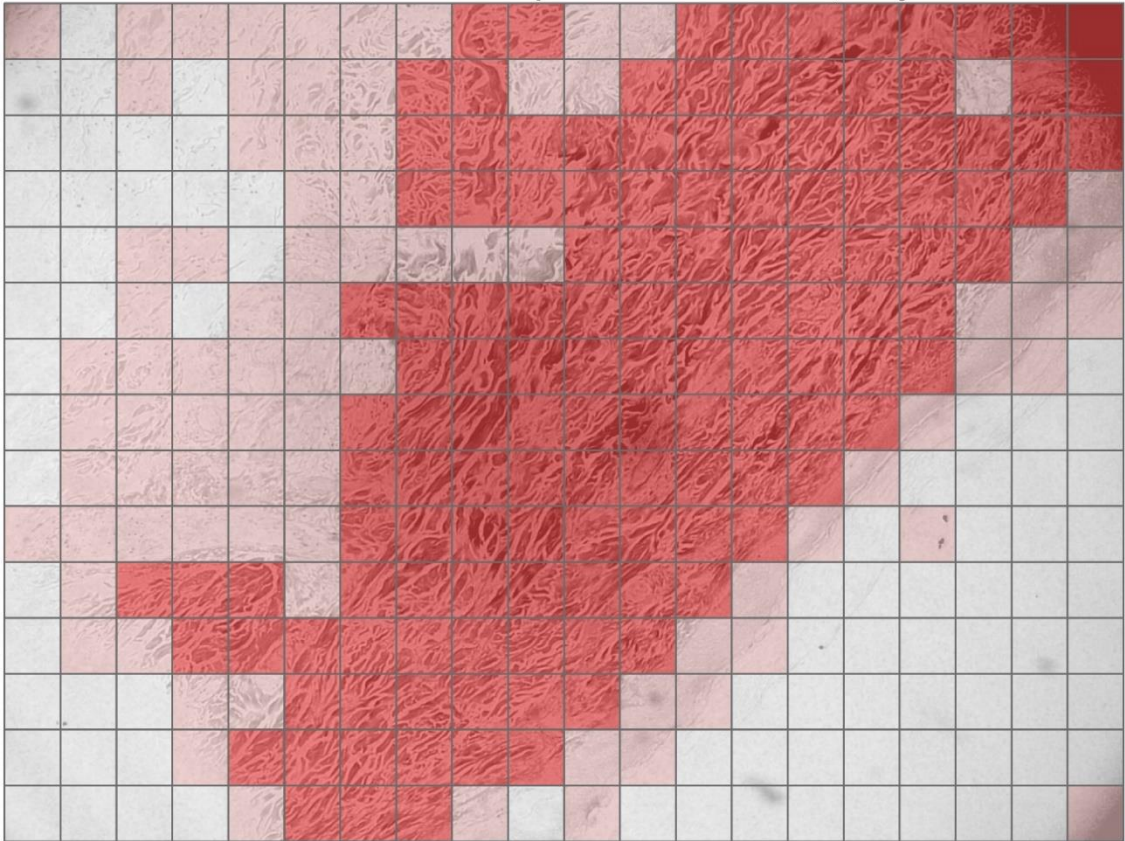
На основе полученной классификации наглядно продемонстрировано отличие микрофотографии тканей пациентов с отморожением III-IV степени на 30 сутки от контрольной группы (Рисунок 3.9).

Количество окрашенных блоков (Рисунок 3.9) в каждом классе характеризует площадь повреждения коллагеновых волокон в поле зрения микрофотографии.

Таким образом, изменение толщины и структуры коллагеновых волокон при холодовой травме является фактором, позволяющим выполнить диагностику микрофотографий с помощью ГИС-технологий.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что при отморожениях происходит выраженное повреждение тканей, сопровождающееся деструктивными процессами компонентов внеклеточного матрикса. Низкие температуры способствуют изменению ширины и ориентации коллагеновых волокон в зоне повреждения, что наглядно продемонстрировано на микрофотографиях.

Ткани пациентов с отморожением III-IV степени, 30 суток



Ткани пациента из контрольной группы

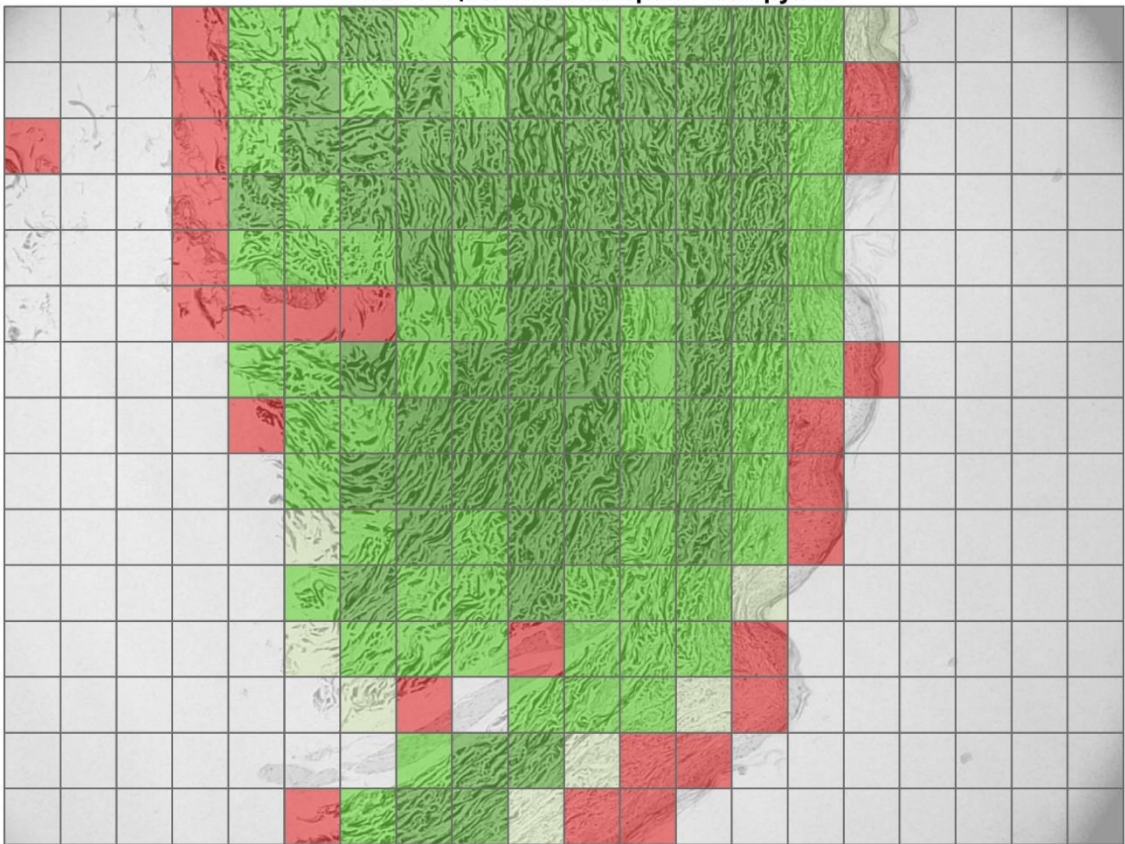


Рисунок 3.9 – Классификация микрофотографии по значениям стандартного отклонения КК. Фото автора

3.6 Закономерности морфологических и патофизиологических изменений в тканях при местной холодовой травме

Исходя из данных, полученных при патоморфологических и лабораторных исследованиях прослеживается взаимосвязь между уровнем MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1, активностью в системе ПОЛ-АОС и гистологическими изменениями в тканях зоны криоповреждения.

Так, в ранние сроки после отморожений уровень MMP-2 и MMP-9, повышается относительно группы контроля. В поздние сроки уровень MMP-2 снижался до значений контрольной группы, а показатели MMP-9 оставались выше нормы в поздние сроки с момента травмы, что обуславливает значительное количество поздних осложнений у пациентов с холодовыми поражениями.

В это время в тканях наблюдаются дистрофические и некротические изменения. Из-за повышения уровня эндопептидаз происходит нарушение процессов ремоделирования тканей, ангиогенеза, пролиферации и репарации. Однако выраженность таких изменений различна и зависит от вида ткани, ее чувствительности к низким температурам и потребности в интенсивном кровоснабжении. Следовательно, чем выше уровень желатиназ (MMP-2 и MMP-9), тем сильнее повреждение тканей и выраженность воспалительных, дистрофических и некротических изменений. А чем интенсивнее воспаление, тем выше уровень молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1, которые выделяются клетками в ответ на повреждение. Их уровень наиболее превышает показатели контроля в ранние сроки и остается высоким в поздние сроки после получения холодовой травмы. Как раз в этот промежуток времени разворачивается яркая клиническая картина отморожений и выраженные морфологические изменения в тканях зоны криодеструкции.

«Окислительный стресс» у больных с местной холодовой травмой проявлялся менее значимо. Однако изменения ПОЛ и антиоксидантной защиты у больных с холодовыми поражениями происходили в результате изначального

влияния низких температур на ферментные системы зоны поражения. В дальнейшем, они отражали последующие сдвиги локального кровообращения и тканевого обмена и играли важную роль в развитии воспалительной реакции, изменения секреторной активности клеток эндотелия, состояния гемостаза и фибринолиза. Сдвиги в системе ПОЛ-антиоксиданты, несомненно, являются неотъемлемыми звеньями патогенеза развития некроза тканей и течения раневого процесса при глубоких отморожениях. Следовательно, развитие морфологических изменений в тканях тесно взаимосвязано с процессами липопероксидации.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что активность в системе ПОЛ-АОС, высокий уровень в сыворотке крови матриксных металлопротеиназ, а также молекул межклеточной адгезии тесно взаимосвязаны с патологическими изменениями в тканях при холодовой альтерации. Концентрация их остается выше показателей контроля в позднем реактивном периоде, в периоде гранулирования и эпителизации.

Известно, что при отморожениях происходит дисфункция эндотелия, приводящая к нарушению равновесия между образованием вазодилатирующих, атромбогенных, антипролиферативных факторов и вазоконстриктивных, протромботических и пролиферативных веществ, которые синтезирует эндотелий [55]. Вместе с этим происходит синтез биологически активных веществ, секреция медиаторов воспаления, что приводит к еще большему повреждению эндотелия, которое предшествует морфологическим изменениям в сосудистой стенке [17, 55]. Гистологически в стенках сосудов отмечается воспалительная инфильтрация, утолщение стенок за счет разрастания соединительной ткани, сужение просвета, вплоть до полной облитерации. В дальнейшем замедляется кровоток, в сосудах формируются тромбы, усугубляющие гипоксию в тканях и обуславливающие вторичные морфологические изменения.

На диаграммах показана динамика исследованных параметров в зависимости от периода холодовой травмы (Рисунок 3.10) и от массива пораженных тканей (Рисунок 3.11). Для наглядности вертикальный масштаб

принят логарифмическим, а показатели представлены нормированными значениями. Нормирование выполнено значением медианы по каждому параметру.

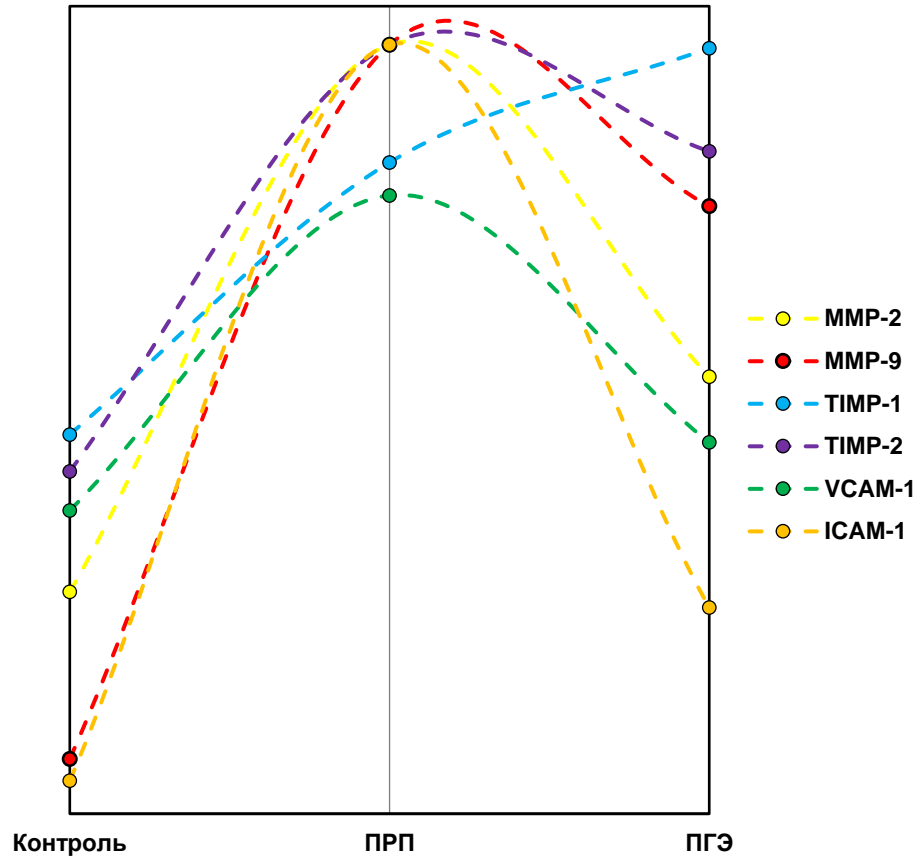


Рисунок 3.10 – Динамика нормированных значений медиан [Me] (MMP-2; MMP-9; TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; VCAM-1) (нг/мл) в исследуемых периодах

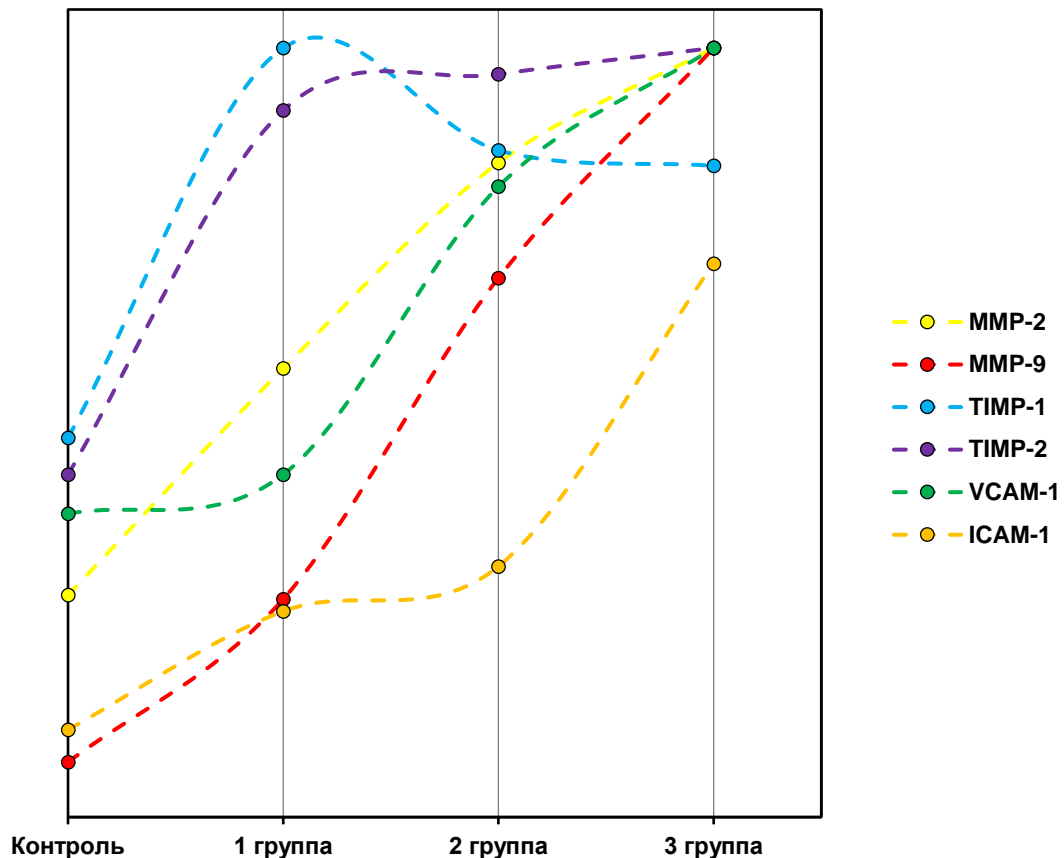


Рисунок 3.11 – Динамика нормированных значений медиан [Me] (MMP-2; MMP-9; TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; VCAM-1) (нг/мл) в исследуемых группах

На диаграмме (Рисунок 3.10) показано, что в ранние сроки с момента получения холодовой травмы регистрируется повышение концентрации в сыворотке крови всех исследованных параметров (MMP-2; MMP-9; TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; VCAM-1). Что соответствует позднему реактивному периоду криповреждения. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что в тканях зоны отморожения развиваются выраженное воспаление, процессы эндотелиальной дисфункции, перекисного окисления липидов, что способствует секреции не только вышеуказанных показателей, но и других биологически активных веществ. В этот период на первое место выходят сосудистые изменения, усугубляющие гипоксию и деструктивные изменения в тканях. В поздние сроки, что соответствует периоду гранулирования и эпителизации наблюдается снижение уровня коллагеназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии, однако остается выше показателей контроля. Это говорит о том, что в тканях зоны

холодовой альтерации повреждение сохраняется длительное время и способствует затяжному течению раневого процесса. Таким образом, на диаграмме (Рисунок 3.10) наглядно продемонстрированы общие закономерности патофизиологических изменений параметров в позднем реактивном периоде и периоде гранулирования и эпителизации местной холодной травмы конечностей.

На диаграмме (Рисунок 3.11) показано, что у пациентов с холодной травмой в зависимости от степени тяжести повреждения так же нарастала концентрация в сыворотке крови исследованных показателей. Так, у пациентов первой группы с отморожениями только пальцев отмечено резкое повышение уровня MMP-2; MMP-9; TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; VCAM-1 относительно контроля. У пациентов с отморожениями на уровне предплюсны и плюсны, а также поражения более проксимальных сегментов конечностей зарегистрированы показатели выше уровня первой группы. Таким образом, выявлена закономерность, что с увеличением массива поражения возрастает концентрация всех исследованных показателей.

Одним из критериев изменчивости уровня поражения тканей при отморожениях является показатель важности независимой переменной.

На диаграмме (Рисунок 3.12) показано, что наибольшей изменчивостью при местной холодной травме в зависимости от периода обладают ICAM-1, MMP-9, MMP-2. То есть данные показатели наиболее отличаются от показателей контрольной группы между периодами криповреждения, а также в группах пациентов с различной степенью тяжести отморожений. Это говорит о том, что в позднем реактивном периоде резко повышается уровень металлопротеиназ и молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, что свидетельствует о выраженности воспалительных и деструктивных процессах в тканях зоны холодого поражения. У пациентов, разделенных на группы, уровень вышеуказанных показателей также возрастает с увеличением массива пораженных тканей. Однако, в периоде гранулирования и эпителизации концентрация их в сыворотке крови остается высокой или незначительно снижается. Данный феномен подтверждает тот факт, что эти параметры являются диагностически значимыми

при холодовом поражении и могут служить основой для прогнозирования течения раневого процесса при холодной альтерации.

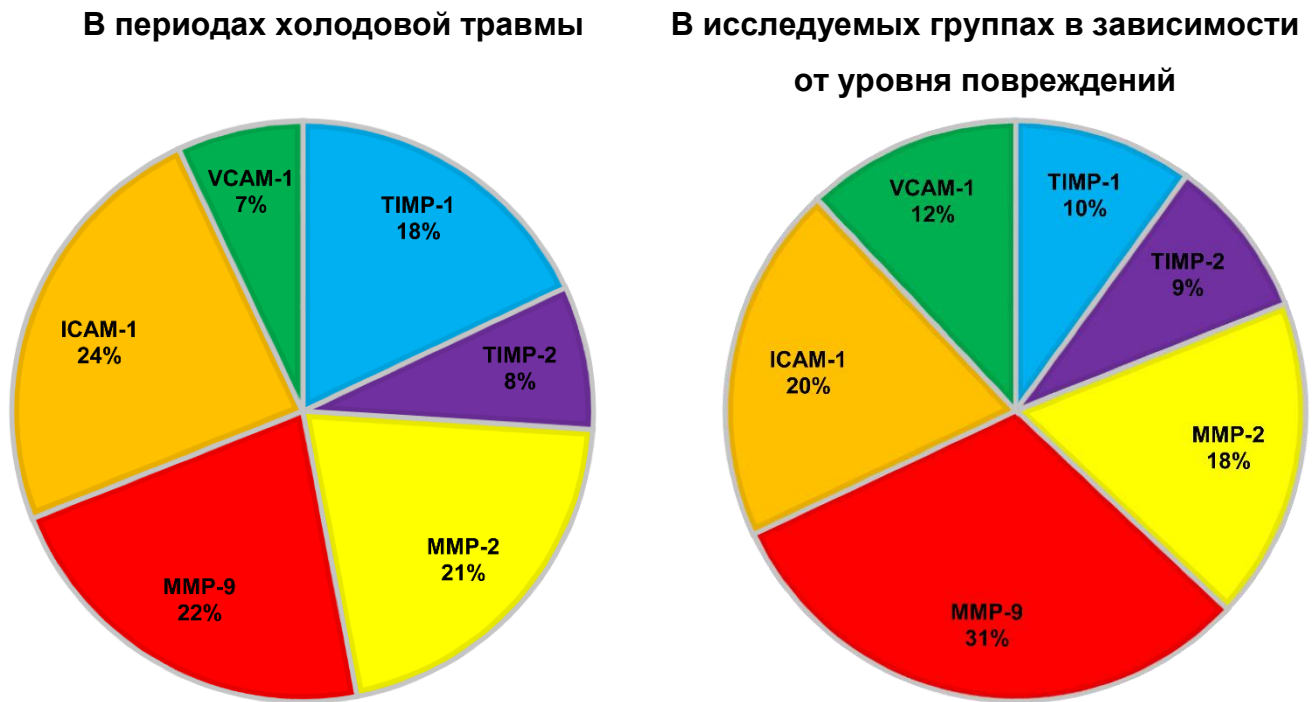


Рисунок 3.12 – Показатель важности независимой переменной значений матричных металлопротеиназ, их ингибиторов и активности молекул межклеточной адгезии при отморожениях

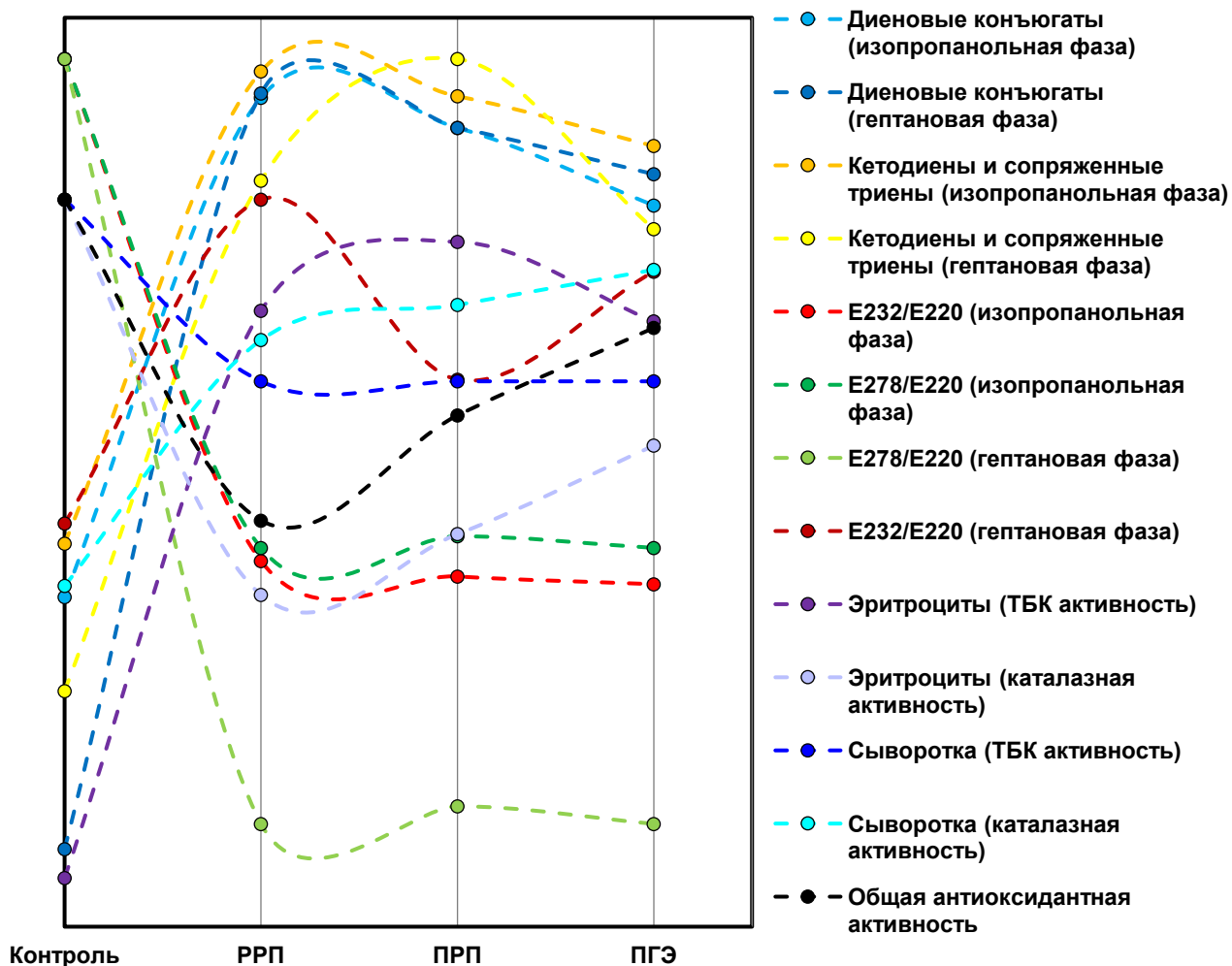


Рисунок 3.13 – Динамика нормированных значений медиан [Me] первичных продуктов ПОЛ у пострадавших с отморожениями в разные периоды травмы

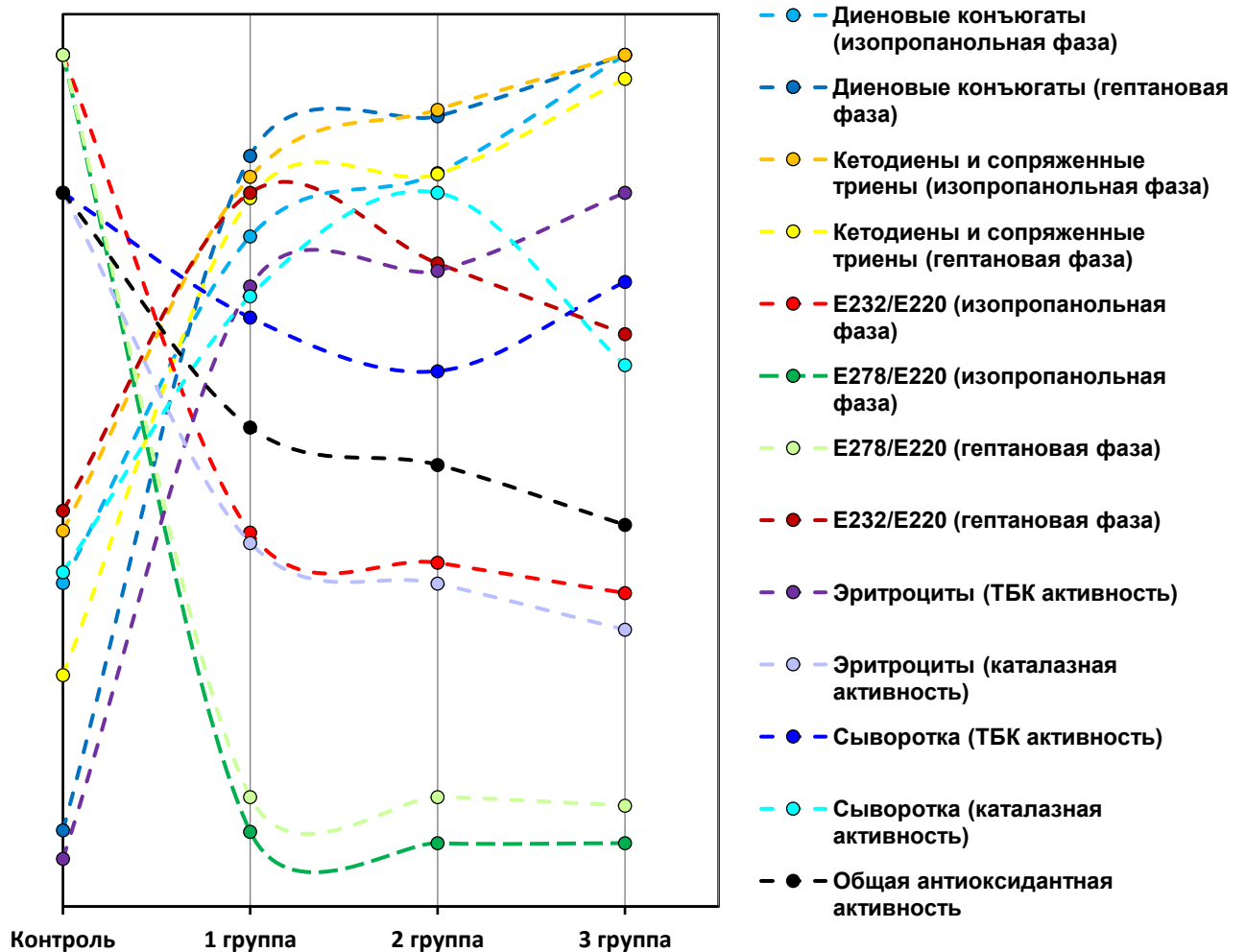


Рисунок 3.14 – Динамика нормированных значений медиан [Me] первичных продуктов ПОЛ у пострадавших с различной тяжестью местной холодовой травмы

На диаграммах (Рисунок 3.13, 3.14) представлена динамика первичных продуктов ПОЛ в разные периоды местной холодовой травмы и в зависимости от степени тяжести криповреждения. Отмечается повышение диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов во все периоды травмы, а также во всех группах пациентов с отморожениями. Значение коэффициентов E232/E220 и E278/E220 изопропанольной фазы снижается. В гептановой фазе E232/E220 не меняется, а E278/E220 снижается. Значимой динамики остальных показателей не наблюдалось. Однако, несмотря на это, данные графики доказывают образование первичных продуктов ПОЛ в зоне альтерации и участие их в патогенезе местной холодовой травмы.

В периодах холодовой травмы



В исследуемых группах в зависимости от уровня повреждений



Рисунок 3.15 – Показатель важности независимой переменной значений активности в системе ПОЛ-AOC при местной холодовой травме

На рисунке 3.15 показано, что наибольшей изменчивостью среди первичных продуктов ПОЛ при местной холодовой травме обладают кетодиены и сопряженные триены изопропанольной фазы, диеновые конъюгаты изопропанольной и гептановой фаз, каталазная активонсть эритроцитов. Наименьшая важность у таких показателей как каталазная активность сыворотки и общая антиоксидантная активность. Данные изменения доказывают, что состояние системы ПОЛ-АОС при местной холодовой травме находится в состоянии динамического равновесия, так как процент показателя важности переменных некоторых продуктов ПОЛ и продуктов АОС находится практически в одинаковых соотношениях.

3.6 Корреляционные связи патофизиологических процессов при холодовой травме

3.6.1 Связь между содержанием матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях

Корреляционный анализ выполнен для параметров (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ICAM-1, VCAM-1) предварительно классифицированных по периодам отморожения (Рисунок 3.16) и по степени тяжести поражения (Рисунок 3.17). Для характеристики результатов исследования использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Знак корреляции указывает на прямую связь между всеми параметрами.

Установлена прямая сильная связь в исследуемых периодах при отморожениях между параметрами MMP-2, MMP-9 и ICAM-1. Самый высокий коэффициент корреляции (0,85; $p < 0,001$) отмечен между MMP-2 и ICAM-1. Эти параметры значительно повышаются в позднем реактивном периоде относительно контроля. Известно, что экспрессия ICAM-1 индуцируется при воспалении и дисфункции эндотелия под воздействием свободных радикалов, компонентов комплемента, оксида азота, липополисахаридов, провоспалительных цитокинов (IL-1, 6 и 8, TNF α , IFN- γ), лейкотриенов, гистамина, тромбина и многих других медиаторов [62]. Уровень MMP-2 в крови так же повышается при воспалении, повреждении тканей [54]. Доказано, что активность MMP изменяется в рамках раневого процесса. Так, количество фибробластов и фибробластоподобных клеток значительно увеличивается при повреждении тканей, что связано с первичным усилением их миграции, а затем нарастанием и усилением их пролиферации [54]. Данные клетки являются основными продуцентами MMP-2. Следовательно, при активной миграции и пролиферации фибробластов усиливается экспрессия MMP-2 [29, 199]. При повреждении тканей при холодом воздействии запускаются так же процессы эндотелиальной дисфункции [98]. Последнее означает, что секреция молекулы

межклеточной адгезии ICAM-1 и матриксной металлопротеинзы MMP-2 ввиду резкого повышения их уровня при криповреждении и общих механизмах, способствующих их продукции, доказывает очень сильную корреляционную зависимость. Таким образом, повреждение эндотелия и других тканей при холодовой травме являлось пусковым фактором развития воспалительной реакции и продукции желатиназ и молекул межклеточной адгезии. Появление зоны деструкции привлекало и активировало макрофаги, нейтрофильные лейкоциты, фибробласты, Т-лимфоциты, которые способны активно продуцировать MMP-2, MMP-9 после стимуляции их цитокинами [97].

В исследуемых периодах холодовой травмы TIMP-1 обладает самыми низкими коэффициентами корреляции по отношению к остальным показателям.

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	ICAM-1	VCAM-1	Условные обозначения
MMP-2		0,75 $p < 0,001$	0,28 $p = 0,004$	0,65 $p < 0,001$	0,85 $p < 0,001$	0,66 $p < 0,001$	Очень сильная
MMP-9	0,75 $p < 0,001$		0,33 $p = 0,001$	0,60 $p < 0,001$	0,72 $p < 0,001$	0,50 $p < 0,001$	Сильная
TIMP-1	0,28 $p = 0,004$	0,33 $p = 0,001$		0,35 $p < 0,001$	0,32 $p = 0,001$	0,15 $p = 0,144$	Относительно сильная
TIMP-2	0,65 $p < 0,001$	0,60 $p < 0,001$	0,35 $p < 0,001$		0,66 $p < 0,001$	0,35 $p < 0,001$	Средняя
ICAM-1	0,85 $p < 0,001$	0,72 $p < 0,001$	0,32 $p = 0,001$	0,66 $p < 0,001$		0,62 $p < 0,001$	Слабая
VCAM-1	0,66 $p < 0,001$	0,50 $p < 0,001$	0,15 $p = 0,144$	0,35 $p < 0,001$	0,62 $p < 0,001$		Несущественная

Рисунок 3.16 – Корреляционные связи матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и активности молекул межклеточной адгезии при отморожениях в исследуемых периодах

В исследуемых группах по уровню поражения при отморожении (Рисунок 3.19) наиболее тесная связь наблюдается между параметрами MMP-2, MMP-9, ICAM-1 и VCAM-1. Установлена прямая сильная связь между MMP-2 и MMP-9, коэффициент корреляции (0,87; $p < 0,001$). Данные ферменты входят в одну группу

матриксных металлопротеиназ – желатиназы (желатиназа А (ММР-2) и желатиназа В (ММР-9). В физиологических условиях их уровень низкий, экспрессия индуцируется различными цитокинами/хемокинами. Желатиназа ММР-9 принимает участие в процессах воспаления, ремоделирования тканей и репарации, а также мобилизации матрикс-связанных факторов роста и процессинга цитокинов [157]. Высокий коэффициент корреляции также объясняется тем, что ММР-9 обладает стимулирующим эффектом, а ММР-2 ингибиторным эффектом в отношении воспаления. При холодовой альтерации ярко выражена картина воспаления, поэтому уровень ММР-2 и ММР-9 повышается и остается на высоких цифрах по мере увеличения объема поврежденных холодом тканей.

ТИМР-1 обладает самыми низкими коэффициентами корреляции, это означает что связь с остальными показателями отсутствует.

	ММР-2	ММР-9	ТИМР-1	ТИМР-2	ICAM-1	VCAM-1	Условные обозначения
ММР-2		0,87 p<0,001	0,09 p=0,281	0,48 p<0,001	0,80 p<0,001	0,76 p<0,001	Очень сильная
ММР-9	0,87 p<0,001		0,05 p=0,589	0,45 p<0,001	0,84 p<0,001	0,75 p<0,001	Сильная
ТИМР-1	0,09 p=0,281	0,05 p=0,589		0,36 p=0,001	0,08 p=0,339	-0,14 p=0,096	Относительно сильная
ТИМР-2	0,48 p<0,001	0,45 p<0,001	0,36 p=0,001		0,48 p<0,001	0,29 p<0,001	Средняя
ICAM-1	0,80 p<0,001	0,84 p<0,001	0,08 p=0,339	0,48 p<0,001		0,67 p<0,001	Слабая
VCAM-1	0,76 p<0,001	0,75 p<0,001	-0,14 p=0,096	0,29 p<0,001	0,67 p<0,001		Несущественная

Рисунок 3.17 – Корреляционные связи матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и активности молекул межклеточной адгезии при отморожениях в исследуемых группах

Наличие корреляционной зависимости между ММР-2, ММР-9, ICAM-1 и VCAM-1 объясняется их достаточно высоким уровнем в сыворотке крови у пациентов с отморожениями относительно группы контроля. Все участники

процесса криповреждения имеют значительную изменчивость в развитии холодной альтерации. Экспрессия желатиназ и молекул межклеточной адгезии индуцируется медиаторами воспаления, которое инициируется криповреждением и процессом эндотелиальной дисфункции, биомаркером которого они являются. Общими являются и клетки, которые продуцируют данные ферменты (фибробласты, лейкоциты, макрофаги, моноциты), активно участвующие в воспалении, иммунном ответе, раневом процессе, процессах заживления и репарации тканей.

Корреляционная зависимость между TIMP-1 и TIMP-2 практически отсутствует. В ходе наших исследований выявлено, что уровень данных показателей повышается в зависимости от периода травмы и массива пораженных холодом тканей. Так, уровень TIMP-1 и TIMP-2 превышает показатели контрольной группы в среднем в 2 раза. Несмотря на это, уровень TIMP-1 продолжает повышаться к 30 суткам, а уровень TIMP-2 снижается. Вероятно, из-за такой динамики процесса, связь между данными показателями слабая.

3.6.2 Связь показателей в системе ПОЛ-АОС при местной холодовой травме

Корреляционный анализ выполнен для параметров системы ПОЛ-АОС предварительно классифицированных по периодам отморозения (Рисунок 3.18) и по степени тяжести поражения (Рисунок 3.19). Для характеристики результатов исследования использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

		Изопропанольная фаза				Гептановая фаза				Эритроциты		Сыворотка		
		ДК	КД и СТ	E232/E220	E278/E220	ДК	КД и СТ	E232/E220	E278/E220	ТБК активность	Каталазная активность	ТБК активность	Каталазная активность	ОАА
Изопропанольная фаза	ДК		0,60 p<0,001	-0,34 p<0,001	-0,47 p<0,001	0,62 p<0,001	0,57 p<0,001	0,20 p=0,036	-0,42 p<0,001	0,50 p<0,001	-0,63 p<0,001	-0,38 p<0,001	0,32 p=0,001	-0,26 p=0,006
	КД и СТ	0,60 p<0,001		-0,33 p<0,001	-0,44 p<0,001	0,65 p<0,001	0,63 p<0,001	0,30 p=0,001	-0,36 p<0,001	0,52 p<0,001	-0,63 p<0,001	-0,22 p=0,016	0,27 p=0,004	-0,33 p<0,001
	E232/E220	-0,34 p<0,001	-0,33 p<0,001		0,43 p<0,001	-0,24 p=0,012	-0,35 p<0,001	-0,23 p=0,014	0,39 p<0,001	-0,45 p<0,001	0,20 p=0,031	0,31 p=0,001	-0,48 p<0,001	-0,12 p=0,197
	E278/E220	-0,47 p<0,001	-0,44 p<0,001	0,43 p<0,001		-0,47 p<0,001	-0,39 p<0,001	-0,19 p=0,038	0,47 p<0,001	-0,37 p<0,001	0,51 p<0,001	0,29 p=0,010	-0,44 p<0,001	0,25 p=0,007
Гептановая фаза	ДК	0,62 p<0,001	0,65 p<0,001	-0,24 p=0,012	-0,47 p<0,001		0,60 p<0,001	0,33 p<0,001	-0,48 p<0,001	0,40 p<0,001	-0,76 p<0,001	-0,22 p=0,020	0,32 p=0,001	-0,29 p=0,002
	КД и СТ	0,57 p<0,001	0,63 p<0,001	-0,35 p<0,001	-0,39 p<0,001	0,60 p<0,001		0,08 p=0,630	-0,22 p=0,021	0,60 p<0,001	-0,56 p<0,001	-0,22 p=0,018	0,28 p=0,003	-0,24 p=0,010
	E232/E220	0,20 p=0,036	0,30 p=0,001	-0,23 p=0,014	-0,19 p=0,038	0,33 p<0,001	0,08 p=0,630		-0,35 p<0,001	0,09 p=0,362	-0,28 p=0,002	-0,12 p=0,207	0,28 p=0,002	-0,16 p=0,084
	E278/E220	-0,42 p<0,001	-0,36 p<0,001	0,39 p<0,001	0,47 p<0,001	-0,48 p<0,001	-0,22 p=0,021	-0,35 p<0,001		-0,32 p<0,001	0,53 p<0,001	0,28 p=0,003	-0,33 p<0,001	0,18 p=0,057
Эритроциты	ТБК активность	0,50 p<0,001	0,52 p<0,001	-0,45 p<0,001	-0,37 p<0,001	0,40 p<0,001	0,60 p<0,001	0,09 p=0,362	-0,32 p<0,001		-0,41 p<0,001	-0,26 p=0,006	0,38 p<0,001	-0,20 p=0,028
	Каталазная активность	-0,63 p<0,001	-0,63 p<0,001	0,20 p=0,031	0,51 p<0,001	-0,76 p<0,001	-0,56 p<0,001	-0,28 p=0,002	0,53 p<0,001	-0,41 p<0,001		0,28 p=0,003	-0,30 p=0,001	0,36 p<0,001
Сыворотка	ТБК активность	-0,38 p<0,001	-0,22 p=0,016	0,31 p=0,001	0,29 p=0,010	-0,22 p=0,020	-0,22 p=0,018	-0,12 p=0,207	0,28 p=0,003	-0,26 p=0,006	0,28 p=0,003		-0,17 p=0,070	0,15 p=0,107
	Каталазная активность	0,32 p=0,001	0,27 p=0,004	-0,48 p<0,001	-0,44 p<0,001	0,32 p=0,001	0,28 p=0,003	0,28 p=0,002	-0,33 p<0,001	0,38 p<0,001	-0,30 p=0,001	-0,17 p=0,070		-0,21 p=0,025
	ОАА	-0,26 p=0,006	-0,33 p<0,001	-0,12 p=0,197	0,25 p=0,007	-0,29 p=0,002	-0,24 p=0,010	-0,16 p=0,084	0,18 p=0,057	-0,20 p=0,028	0,36 p<0,001	0,15 p=0,107	-0,21 p=0,025	
Условные обозначения		Очень сильная		Сильная		Относительно сильная		Средняя		Слабая		Несущественная		

Рисунок 3.18 – Корреляционные связи в системе ПОЛ-АОС при местной холодовой травме в исследуемых периодах

Положительный знак корреляции указывает на прямую связь, а отрицательный на обратную связь между параметрами двух выборок.

Между ДК и КД и СТ обеих фаз установлена прямая относительно сильная (0,57; 0,60) и сильная (0,62; 0,65) связь в исследуемых периодах при отморожениях, при достигнутом уровне статистической значимости $p < 0,001$. При этом у ДК обеих фаз установлена сильная обратная зависимость с каталазной активностью эритроцитов (-0,63; -0,76), при достигнутом уровне статистической значимости $p < 0,001$ (Рисунок 3.37). Данный феномен объясняется тем, что при холодной альтерации активность каталазы в эритроцитах резко снижается в связи с изменением их резистентности и разрушением. Одновременно с этим, повышается активность в системе перекисного окисления липидов, что сопровождается увеличением концентрации вторичных продуктов ПОЛ. Результаты наших исследований согласуются с полученными ранее данными о том, что при введении в организм лабораторных животных пятиокси ванадия нарушение системы антиоксидантной системы организма проявляется изменением резистентности эритроцитов и их разрушением, а также выраженной тенденцией к снижению активности каталазы [38, 66].

В исследуемых периодах холодной травмы коэффициент E232/E220 в изопропанольной и гептановой фазах обладает самыми низкими коэффициентами корреляции по отношению к остальным показателям. Между ними установлена средняя и слабая сила связи.

Следует отметить, что у показателей сыворотки крови (ТБК-активность, каталазная активность, общая антиоксидантная активность) отмечается самая слабая корреляционная связь с другими участниками системы ПОЛ-антиоксиданты. Это объясняется тем, что уровень данных показателей в динамике практически не меняется или имеет тенденцию к снижению концентрации. Результаты наших исследований хорошо корреспондируются с ретроспективными материалами, в которых было обнаружено снижение активности каталазы сыворотки и эритроцитов, антиоксидантной активности сыворотки у больных остеоартрозом [3]. У пациентов в дореактивном периоде

местной холодовой травмы так же отмечается недостоверное повышение активности каталазы в сыворотке крови [70].

В целом, в исследуемых периодах холодовой травмы у большинства показателей в системе ПОЛ-АОС отмечается средняя или слабая связь. Это обусловлено тем, что в РРП и ПРП наблюдаются экстремальные значения, которые постепенно восстанавливаются к ПГЭ.

Наиболее тесная связь в исследуемых группах по уровню поражения при отморожении наблюдается у показателей в изопропанольной фазе (Рисунок 3.19). Здесь отмечаются высокие коэффициент корреляции (-0,85) при достигнутом уровне статистической значимости $p < 0,001$.

Показатели активности сыворотки обладают низкими коэффициентами корреляции, это означает, что их связь с остальными показателями отсутствует.

		Изопропанольная фаза				Гептановая фаза				Эритроциты		Сыворотка		
		ДК	КД и СТ	E232/E220	E278/E220	ДК	КД и СТ	E232/E220	E278/E220	ТБК активность	Каталазная активность	ТБК активность	Каталазная активность	ОАА
Изопропанольная фаза	ДК		0,78 p<0,001	-0,85 p<0,001	-0,80 p<0,001	0,82 p<0,001	0,74 p<0,001	0,20 p=0,084	-0,73 p<0,001	0,75 p<0,001	-0,77 p<0,001	-0,36 p=0,002	0,42 p<0,001	-0,50 p<0,001
	КД и СТ	0,78 p<0,001		-0,79 p<0,001	-0,80 p<0,001	0,83 p<0,001	0,72 p<0,001	0,23 p=0,045	-0,65 p<0,001	0,80 p<0,001	-0,76 p<0,001	-0,35 p=0,003	0,35 p=0,003	-0,46 p<0,001
	E232/E220	-0,85 p<0,001	-0,79 p<0,001		0,83 p<0,001	-0,84 p<0,001	-0,74 p<0,001	-0,15 p=0,219	0,65 p<0,001	-0,77 p<0,001	0,79 p<0,001	0,35 p=0,002	-0,45 p<0,001	-0,48 p<0,001
	E278/E220	-0,80 p<0,001	-0,80 p<0,001	0,83 p<0,001		-0,81 p<0,001	-0,76 p<0,001	-0,13 p=0,275	0,65 p<0,001	-0,74 p<0,001	0,80 p<0,001	0,30 p=0,010	-0,40 p<0,001	0,43 p<0,001
Гептановая фаза	ДК	0,82 p<0,001	0,83 p<0,001	-0,84 p<0,001	-0,81 p<0,001		0,72 p<0,001	0,23 p=0,048	-0,70 p<0,001	0,86 p<0,001	-0,82 p<0,001	-0,26 p=0,026	0,40 p<0,001	-0,50 p<0,001
	КД и СТ	0,74 p<0,001	0,72 p<0,001	-0,74 p<0,001	-0,76 p<0,001	0,72 p<0,001		0,25 p=0,028	-0,72 p<0,001	0,79 p<0,001	-0,78 p<0,001	-0,23 p=0,052	0,40 p<0,001	-0,48 p<0,001
	E232/E220	0,20 p=0,084	0,23 p=0,045	-0,15 p=0,219	-0,13 p=0,275	0,23 p=0,048	0,25 p=0,028		-0,39 p=0,001	0,26 p=0,031	-0,20 p=0,082	-0,22 p=0,065	0,40 p<0,001	-0,24 p=0,036
	E278/E220	-0,73 p<0,001	-0,65 p<0,001	0,65 p<0,001	0,65 p<0,001	-0,70 p<0,001	-0,72 p<0,001	-0,39 p=0,001		-0,75 p<0,001	0,74 p<0,001	0,33 p=0,004	-0,40 p<0,001	0,47 p<0,001
Эритроциты	ТБК активность	0,75 p<0,001	0,80 p<0,001	-0,77 p<0,001	-0,74 p<0,001	0,86 p<0,001	0,79 p<0,001	0,26 p=0,031	-0,75 p<0,001		-0,85 p<0,001	-0,24 p=0,041	0,39 p=0,001	-0,53 p<0,001
	Каталазная активность	-0,77 p<0,001	-0,76 p<0,001	0,79 p<0,001	0,80 p<0,001	-0,82 p<0,001	-0,78 p<0,001	-0,20 p=0,082	0,74 p<0,001	-0,85 p<0,001		0,25 p=0,034	-0,39 p=0,001	0,47 p<0,001
Сыворотка	ТБК активность	-0,36 p=0,002	-0,35 p=0,003	0,35 p=0,002	0,30 p=0,010	-0,26 p=0,026	-0,23 p=0,052	-0,22 p=0,065	0,33 p=0,004	-0,24 p=0,041	0,25 p=0,034		-0,39 p=0,001	0,19 p=0,114
	Каталазная активность	0,42 p<0,001	0,35 p=0,003	-0,45 p<0,001	-0,40 p<0,001	0,40 p<0,001	0,40 p<0,001	0,40 p<0,001	-0,40 p<0,001	0,39 p=0,001	-0,39 p=0,001	-0,39 p=0,001		-0,40 p<0,001
	ОАА	0,50 p<0,001	-0,46 p<0,001	-0,48 p<0,001	0,43 p<0,001	-0,50 p<0,001	-0,48 p<0,001	-0,24 p=0,036	0,47 p<0,001	-0,53 p<0,001	0,47 p<0,001	0,19 p=0,114	-0,40 p<0,001	
Условные обозначения		Очень сильная		Сильная		Относительно сильная		Средняя		Слабая		Несущественная		

Рисунок 3.19 – Корреляционные связи в системе ПОЛ-АОС при местной холодовой травме в исследуемых группах

Таким образом, исходя из результатов, полученных при анализе данных показателей можно сделать вывод о том, что процессы ПОЛ и антиоксидантной системы находятся в состоянии динамического баланса. Корреляционная зависимость между ДК с КД и СТ обеих фаз и каталазной активности эритроцитов исследуемых периодов, а также между показателями изопропанольной фазы в зависимости от массива пораженных тканей подтверждает генерацию первичных

продуктов ПОЛ и антиоксидантной системы, и их значимость в развитии патологических изменений в тканях зоны криодеструкции. При патологии возникают условия, вызывающие нарушения в координации иммунометаболических процессов, приводящие к меньшей сбалансированности приспособительных реакций организма, одними из которых служит баланс системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности [11]. Несмотря на это, показатели находятся в состоянии равновесия и все они участвуют в механизмах очищения ран от продуктов некроза, подготовке к репарации и реализации эффекторных реакций защиты. А в поздние сроки местной холодовой травмы могут быть фактором усугубления раневого процесса, так как показатели антиоксидантной системы не выходят за рамки показателей ПОЛ.

3.6.3 Связь морфометрических изменений коллагеновых волокон с уровнем матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях

Корреляционный анализ выполнен для размеров коллагеновых волокон, стандартного отклонения КК и параметров (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ICAM-1, VCAM-1) в группе контроля и на 30-е сутки с момента получения криотравмы (Рисунок 3.20). Для характеристики результатов исследования использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Положительный знак корреляции указывает на прямую связь, а отрицательный на обратную связь между исследуемыми параметрами.

Ранее было отмечено (в главе 3.5), что толщина коллагеновых волокон имеет сильную прямую связь с показателем стандартного отклонения КК в исследуемой области микрофотографии (-0,75; $p < 0,001$).

Установлена прямая сильная связь между толщиной коллагеновых волокон и параметрами MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 и ICAM-1. Самый высокий коэффициент корреляции параметра толщины коллагеновых волокон установлен с MMP-9 (0,73; $p < 0,001$) (Рисунок 3.20).

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	ICAM-1	VCAM-1
Толщина коллагеновых волокон	0,65 $p < 0,001$	0,73 $p < 0,001$	0,64 $p < 0,001$	0,63 $p < 0,001$	0,66 $p < 0,001$	0,28 $p = 0,031$
Стандартное отклонение КК	-0,63 $p < 0,001$	-0,64 $p < 0,001$	-0,60 $p < 0,001$	-0,59 $p < 0,001$	-0,71 $p < 0,001$	-0,17 $p = 0,198$
Условные обозначения	Очень сильная	Сильная	Относительно сильная	Средняя	Слабая	Несущественная

Рисунок 3.20 – Корреляционные связи морфометрических изменений коллагеновых волокон с уровнем матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и активностью молекул межклеточной адгезии при отморожениях

С перечисленными параметрами отмечена сильная и относительно сильная связь стандартного отклонения КК. Эти параметры значительно повышаются в позднем реактивном периоде относительно контроля.

Таким образом, данный феномен доказывает, что с увеличением уровня в крови матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, молекул межклеточной адгезии происходят качественные изменения коллагеновых волокон. Это выражается в изменении их толщины и ориентации. Высокая концентрация в крови исследованных параметров хорошо коррелирует с деструкцией в коллагеновых волокнах в поздние сроки холодового поражения, что доказывает сильную связь между показателями.

3.7 Модель прогнозирования уровня повреждения тканей на основе содержания матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отмироражениях

На основании анализа уравнения линейной регрессии, в которое были включены исходные показатели (уровень матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии), определена значимость показателей в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отмироражении. Учитывая недостаточную значимость, показатель TIMP-1 ($p=0,048$) удален из структуры исходной модели. Итоговая модель уровня повреждения тканей при отмироражении скорректирована на основе пяти показателей (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, ICAM-1, VCAM-1), имеющих достаточную значимость в структуре прогностической модели (Таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Значимость показателей в структуре модели прогнозирования уровня повреждения тканей при отмироражении

Модель	Нестандартизированные коэффициенты		Стандартизированные коэффициенты		Значимость в структуре модели
	B	Стандартная ошибка	Бета	t	
Константа	-0,71615	0,083		-8,616	<0,001
MMP-2	0,15752	0,021	0,315	7,391	<0,001
MMP-9	0,00231	0,000	0,371	8,272	<0,001
TIMP-2	0,00065	0,000	0,081	3,659	<0,001
ICAM-1	0,04399	0,006	0,223	7,164	<0,001
VCAM-1	0,00317	0,001	0,095	3,310	0,001

Прогностическая модель уровня повреждения тканей при отмироражении определяет группу поражения и выражается следующей формулой:

$$\begin{aligned}
 \text{ПМ}_1 = & 0,15752 \times (\text{MMP-2}) + 0,00231 \times (\text{MMP-9}) + 0,00065 \times (\text{TIMP-2}) + 0,04399 \\
 & \times (\text{ICAM-1}) + 0,00317 \times (\text{VCAM-1}) - 0,71615
 \end{aligned}$$

В результате вычислений модель прогнозируют уровень поражения тканей, при этом характеризуя принадлежность пациента к определенной группе. При показателях модели (ПМ_1) от 0,68 до 1,41 прогнозируют зону деструкции на

уровне пальцев стоп, при показателях модели от 1,42 до 2,38 граница предполагаемого поражения достигает предплюсно-плюсневого сочленения, более 2,38 – до уровня нижней трети голени.

Таблица 3.18 – Определение множественного коэффициента детерминации к модели прогнозирования уровня поражения тканей при отморожении

Модель	R	R ²	Скорректированный R ²	Стандартная ошибка оценки
$PM_1 = 0,15752 \times (MMP-2) + 0,00231 \times (MMP-9) + 0,00065 \times (TIMP-2) + 0,04399 \times (ICAM-1) + 0,00317 \times (VCAM-1) - 0,71615$	0,979	0,959	0,957	0,214

Учитывая значение скорректированного коэффициента детерминации (0,957), можно считать зависимость между коэффициентами модели PM_1 и уровнем деструкции дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме очень сильной.

Для определения информативности исследуемых биомаркеров (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ICAM-1, VCAM-1) в прогнозировании тяжелой степени местной холодовой травмы использовался ROC-анализ. Полученные кривые характеризуются показателем AUC (англ. Area Under Curve, площадь под кривой). Чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор, при этом значение 0,5 демонстрирует непригодность выбранного метода классификации (соответствует случайному гаданию).

На диаграмме (Рисунок 3.21) наиболее качественный классификатор отмечается для кривых: ICAM-1 > MMP-9 > MMP-2 > VCAM-1 > TIMP-2. Кривая TIMP-1 ($p=0,018$) проходит ниже опорной линии ($AUC < 0,5$), что характеризует ее менее пригодной для дальнейшей классификации.

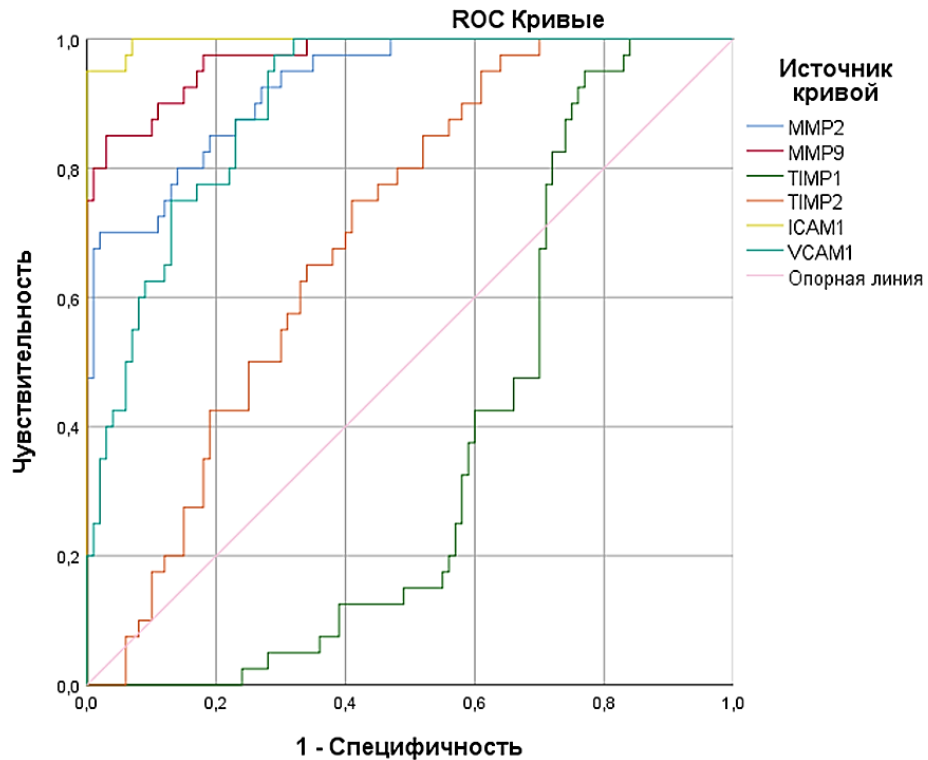


Рисунок 3.21 – ROC-кривые матричных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии при отморожениях в исследуемых группах

Таблица 3.19 – Определение порога обнаружения тяжелого поражения тканей при отморожении на основе ROC-анализа

	Порог обнаружения	AUC (асимптотическая 95% доверительный интервал)	Асимптотическая значимость
MMP-2	$\geq 6,34$	0,92 – (0,88-0,97)	$p < 0,001$
MMP-9	$\geq 322,89$	0,97 – (0,94-0,99)	$p < 0,001$
TIMP-1	$\leq 1263,80$	0,37 – (0,28-0,46)	$p = 0,018$
TIMP-2	$\geq 506,50$	0,69 – (0,61-0,78)	$p < 0,001$
ICAM-1	$\geq 8,23$	0,98 – (0,97-0,99)	$p < 0,001$
VCAM-1	$\geq 83,06$	0,90 – (0,85-0,95)	$p < 0,001$

Выполним проверку показателей порога обнаружения тяжелого поражения при холодной травме. Для этого подставим полученные значения порога обнаружения из таблицы (Таблица 3.19) в модель прогнозирования.

$$PM_1 = (0,15752 \times 6,34 + 0,00231 \times 322,89 + 0,00065 \times 506,50 + 0,04399 \times 8,23 + 0,00317 \times 83,06) - 0,71615 = 1,98 \approx 2$$

Результаты прогнозирования указывают на принадлежность значений модели (PM_1) ко 2-ой группе и характеризует уровень распространения

предполагаемого поражения до предплюсно-плюсневое сочленения. Полученная прогностическая модель (ПМ₁) основана на показателях матричных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии, прогнозировать уровень поражения тканей при местной холодовой травме на момент поступления в стационар.

3.8 Модель прогнозирования уровня повреждения тканей на основе активности в системе ПОЛ-АОС при отмирораениях

На основании анализа уравнения линейной регрессии, в которое были включены исходные показатели системы ПОЛ-АОС, определена значимость показателей в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отмирораении. Из числа значимых показателей системы ПОЛ-АОС ($p < 0,05$), входящих в структуру модели прогнозирования (ПМ₂) включены четыре (Таблица 3.20):

- диеновые коньюгаты (изопропанольная фаза);
- кетодиены и сопряженные триены (изопропанольная фаза);
- диеновые коньюгаты (гептановая фаза);
- эритроциты (каталазная активность).

Остальные показатели системы ПОЛ-АОС исключены из итоговой модели прогнозирования уровня отмирораения при холодовой травме.

Таблица 3.20 – Значимость показателей в структуре модели прогнозирования уровня повреждения тканей при отмирораении

Модель	Нестандартизированные коэффициенты		Стандартизированные коэффициенты		Значимость в структуре модели
	B	Стандартная ошибка	Бета	t	
Константа	1,66952	0,387		0,441	0,022
ДК (изопропанольная фаза)	2,01327	0,409	0,918	4,927	<0,001
КД и СТ (изопропанольная фаза)	2,30767	0,723	0,690	3,192	0,002
ДК (гептановая фаза)	-0,58675	0,183	-0,911	-3,213	0,002
Эритроциты (каталазная активность)	-0,32088	0,179	-0,414	-1,149	0,011

Прогностическая модель уровня повреждения тканей при отмирораении характеризует группу, выражается следующей формулой:

$$\text{ПМ}_2 = (2,01327 \times (\text{ДК изоп.}) + 2,30767 \times (\text{КД и СТ изоп.}) - 0,58675 \times (\text{ДК гептан.}) - 0,32088 \times (\text{Эритроциты каталаз. акт.})) + 0,166952$$

В результате вычислений модель прогнозирует уровень поражения тканей, при этом характеризуя принадлежность пациента к определенной группе. При показателях модели (ПМ_2) от 0,72 до 1,46 прогнозируют зону деструкции на уровне пальцев стоп, при показателях от 1,47 до 2,50 граница предполагаемого поражения распространялась до предплюсно-плюсневого сочленения, более 2,50 – до уровня нижней трети голени.

Таблица 3.21 – Определение множественного коэффициента детерминации полученной модели прогнозирования уровня поражения тканей при отморожении

Модель	R	R ²	Скорректированный R ²	Стандартная ошибка оценки
$\text{ПМ}_2 = (2,01327 \times (\text{ДК изоп.}) + 2,30767 \times (\text{КД и СТ изоп.}) - 0,58675 \times (\text{ДК гептан.}) - 0,32088 \times (\text{Эритроциты каталаз. акт.})) + 0,166952$	0,913	0,835	0,825	0,363

Учитывая значение скорректированного коэффициента детерминации (0,825), можно считать зависимость между коэффициентами модели (ПМ_2) (Таблица 3.21) и уровнем деструкции дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме достаточно сильной.

Для определения порога обнаружения тяжелой степени отморожения выполним анализ классификаций с применением ROC-кривых (ROC-анализ). Чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор, при этом значение 0,5 демонстрирует непригодность выбранного метода классификации (соответствует случайному гаданию). На диаграмме (Рисунок 3.22) наиболее качественные классификатор отмечается для кривых: ДК (изоп.) > ДК (гептан.) > КД и СТ (изоп.) > Эритроциты (каталаз. акт), многие кривые проходит ниже опорной линии $\text{AUC} < 0,5$, что характеризует менее пригодными для дальнейшей классификации.

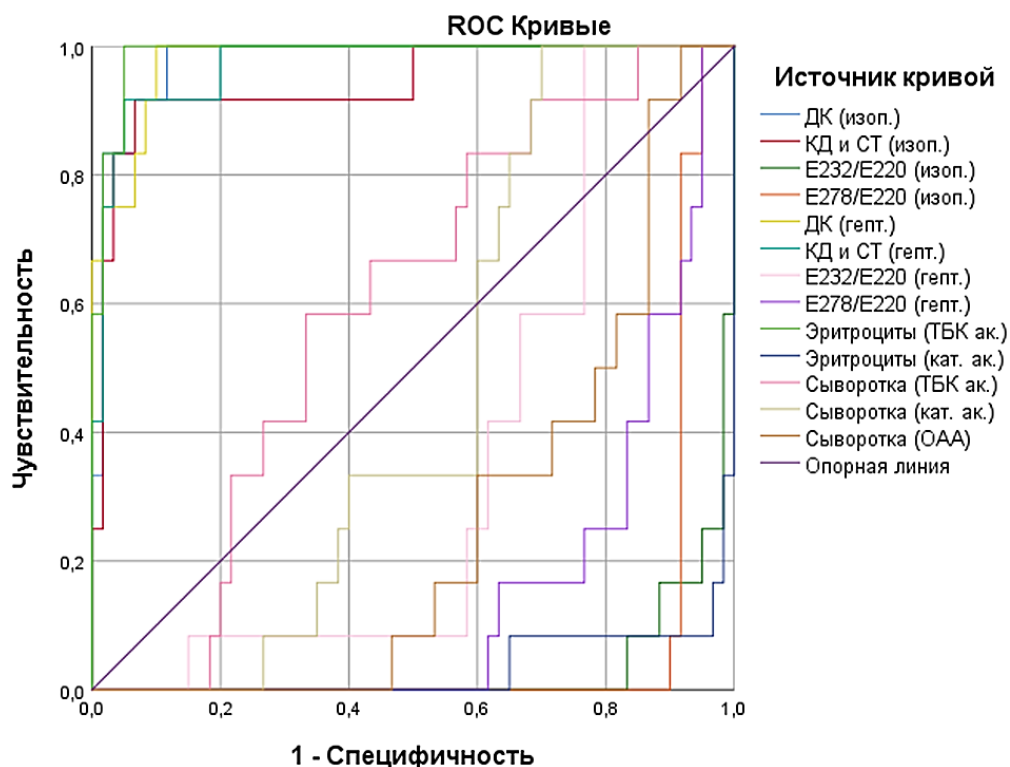


Рисунок 3.22 – ROC-кривые системы ПОЛ-АОС при отморожениях в исследуемых группах

Таблица 3.22 – Определение порога обнаружения тяжелого поражения тканей при отморожении на основе ROC-анализа

Показатель		Порог обнаружения	AUC (асимптотическая 95% доверительный интервал)	Асимптотическая значимость
Изопроранольная фаза	ДК	$\geq 1,78$	0,97 – (0,94-0,99)	$p < 0,001$
	КД и СТ	$\geq 1,15$	0,94 – (0,86-0,99)	$p < 0,001$
	E232/E220	$\leq 0,40$	0,03 – (0,00-0,07)	$p < 0,001$
	E278/E220	$\leq 0,26$	0,07 – (0,01-0,15)	$p < 0,001$
Гептановая фаза	ДК	$\geq 3,91$	0,98 – (0,95-0,99)	$p < 0,001$
	КД и СТ	$\geq 0,29$	0,97 – (0,93-0,99)	$p < 0,001$
	E232/E220	$\leq 0,96$	0,35 – (0,22-0,49)	$p = 0,120$
	E278/E220	$\leq 0,77$	0,15 – (0,06-0,25)	$p < 0,001$
Эритроциты	ТБК активность	$\geq 67,99$	0,97 – (0,98-0,99)	$p < 0,001$
	Каталазная активность	$\leq 11,69$	0,03 – (0,00-0,09)	$p < 0,001$

Показатель		Порог обнаружения	AUC (асимптотическая 95% доверительный интервал)	Асимптотическая значимость
Сыворотка	ТБК активность	$\geq 1,94$	0,59 – (0,44-0,74)	p=0,304
	Каталазная активность	$\leq 1,96$	0,46 – (0,33-0,59)	p=0,672
	ОАА	$\leq 11,49$	0,26 – (0,14-0,38)	p=0,009

Выполним проверку показателей порога обнаружения тяжелого поражения при холодовой травме. Для этого подставим полученные значения порога обнаружения из таблицы (Таблица 3.22) в модель прогнозирования ($ПМ_2$). Несмотря на то, что эритроциты каталазной активности имеют $AUC < 0,5$, их асимптотическая значимость составляет $p < 0,001$, поэтому принято решение не исключать их из уравнения модели прогнозирования.

$$\begin{aligned} ПМ_2 &= (2,01327 \times 1,78 + 2,30767 \times 1,15 - 0,58675 \times 3,91 - 0,32088 \times 11,69) + 1,66952 \\ &= 1,87 \approx 2 \end{aligned}$$

Результаты прогнозирования указывают на принадлежность значений модели ($ПМ_2$) ко 2-ой группе и характеризует уровень распространения предполагаемого поражения до предплюсно-плюсневого сочленения. Полученная прогностическая модель ($ПМ_2$) основана на показателях системы ПОЛ-АОС, позволяет на ранних периодах прогнозировать уровень поражения тканей при местной холодовой травме.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты расширяют представления о патогенетических и воспалительных механизмах течения раневого процесса при холодовой травме. Высокое содержание в сыворотке крови матриксных металлопротеиназ 2 и 9 как в ранние, так и в поздние сроки с момента травмы коррелирует с массивом поврежденных тканей при отморожениях. Так, в наших исследованиях была выявлена зависимость высокого уровня желатиназ от массива и степени тяжести криоповреждения. Очевидно существенное значение активности в системе ММР-ингибиторы в саногенезе при криотравме. Одновременно, при холодовой травме подобная динамика может констатировать о значительном сбое в репарации тканей и ангиогенезе, что является предпосылками для затяжного течения репаративных процессов.

Известно, что ММР-2 (желатиназа А) экспрессируется в мезенхимальных клетках, а также нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [101]. Источниками ММР-9 (желатиназы В) являются кератиноциты, моноциты, лейкоциты, макрофаги и фибробласты [120, 154]. При холодовом поражении прежде всего повреждается кожа с подлежащими тканями, в которой развиваются дистрофические и некротические процессы, гибель клеток эпидермиса и дермы, и как следствие высвобождение из них эндопептидаз (матриксных металлопротеиназ) с последующим повреждением тканевых структур. Данный феномен мы наблюдали при исследовании уровня ММР-2,9 в сыворотке крови у пациентов с глубокими отморожениями.

Повышенное содержание ингибиторов металлопротеиназ указывает на попытку со стороны организма стабилизировать нарушение структуры и функций в очаге альтерации. Нами выявлено резкое повышение ингибиторов матриксных металлопротеиназ (TIMP-1 и TIMP-2) во всех периодах криоповреждения. Уровень TIMP не снижается и на 30 сутки с момента холодовой альтерации.

Данное явление, вероятно, связано с гибелью соединительной ткани, так как TIMP содержится во всех соединительных тканях [109].

При остеоартрите, ревматоидном артрите, остеоартрит, аутоиммунных заболеваниях, периодонтите, гипертонии, а также опухолевой инвазии и метастазировании развивается нарушение регуляции деградации компонентов межклеточного матрикса, а значит, с участием MMP. То есть, желатиназы – одна из причин затяжного и хронического течения заболеваний [54]. Не исключено, что предиктором «хронизации» процессов альтерации у пациентов с МХТ являются именно желатиназы. Это подтверждает и значительное количество неблагоприятных исходов травмы у пострадавших [22, 23, 31]. По мнению многих авторов, осложнения наблюдаются у большинства больных с местной холодовой травмой [10, 28, 32, 71, 135].

Доказано, что устойчивая протеолитическая активность, в основном за счет повышенных уровней MMP, является одним из основных факторов, ответственных за аномальное заживление, наблюдаемое при хронических ранах [145, 149, 167, 177]. Продолжительная активация MMP в микроокружении раны расщепляет не только факторы роста и цитокины, но также в значительной степени изменяет структуру ВКМ, значительно нарушая процесс восстановления [123, 138]. Обзор различных MMP и их дисрегуляция при острых и хронических ранах схематично показан на Рисунке 4.1. В некоторых источниках указывается, что желатиназы, MMP-2 (желатиназа А) и MMP-9 (желатиназа В) обнаруживаются в больших количествах в тканях и экссудатах хронических ран по сравнению с острыми ранами и прилежащими здоровыми тканями [185]. Следовательно, в тканях зоны холодовой альтерации длительное время поддерживается воспаление, обусловленное присутствием высоких концентраций MMP, что в свою очередь препятствует заживлению и репарации тканей при тяжелых отморожениях.

У пациентов с ожогами отмечается повышение концентрации в сыворотке крови MMP-9 и TIMP-1. Явления, наблюдаемые при ожоговых ранах, такие как повышенная проницаемость сосудов, связаны с высвобождением матриксных металлопротеиназ (MMP) и их тканевых ингибиторов (TIMP) после травмы.

Уровень MMP-9 увеличивается в 6,25 раз сразу после травмы по сравнению с контролем и остается на высоких цифрах в течение 7-дневного периода наблюдения. TIMP-1 повышается на 49,5% на седьмой день после инициации термической травмы. Снижение соотношения MMP-9/TIMP-1 в течение 7-дневного периода наблюдения может представлять собой показатель эффективного процесса заживления без гипертрофических рубцов и келоидов у пациентов [172, 184].

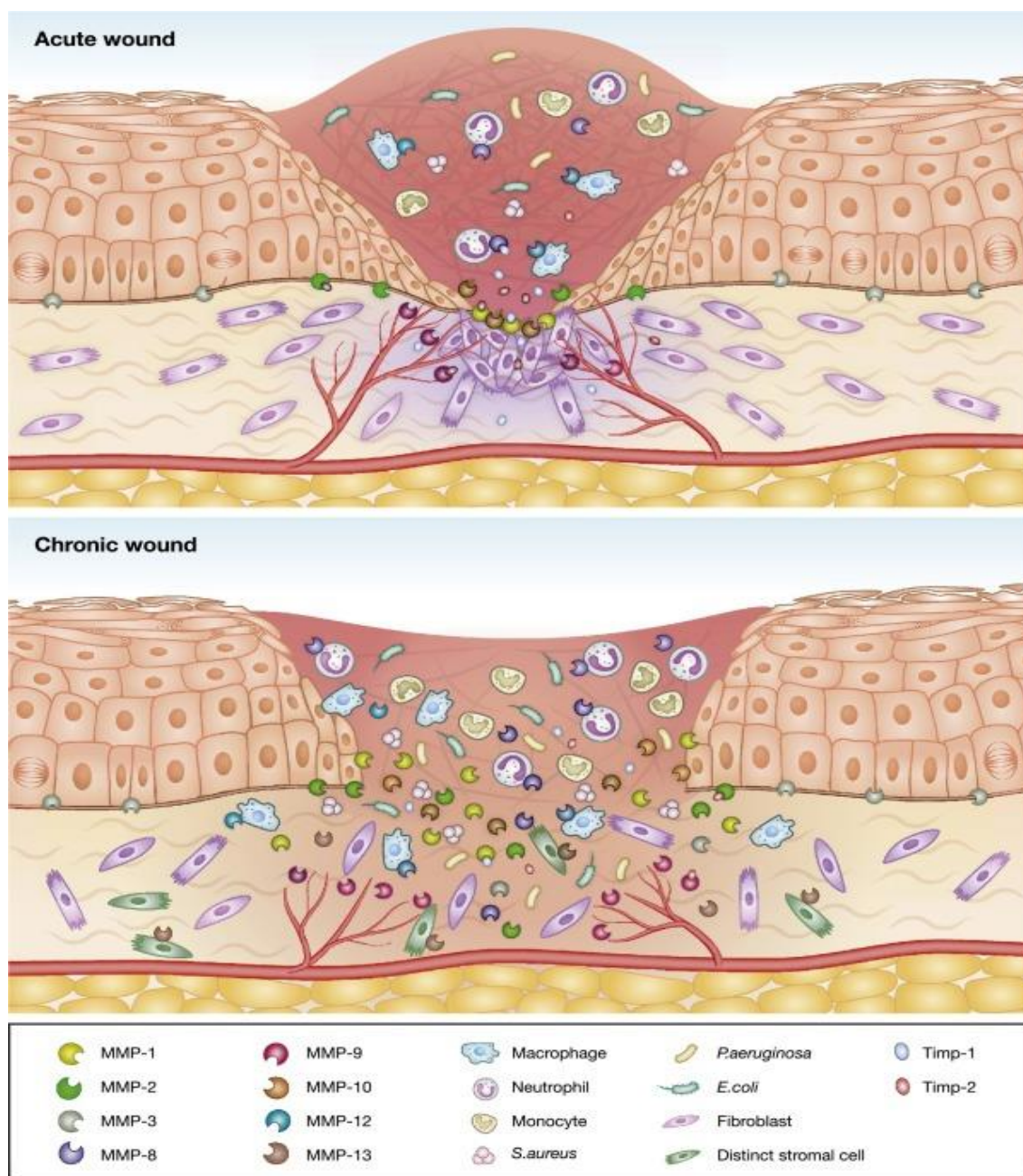


Рисунок. 4.1 – Графическое изображение сценария острой и хронической раны с нарушением регуляции MMP [147]

В исследованиях Raffetto, J.D. et al. доказано, что при хронических венозных язвах нижних конечностей развивается эндотелиальная дисфункция, повреждение гликокаликса и активация матриксных металлопротеиназ (ММР), хемокинов (MCP-1 и MIP-1), молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1), селектинов и регуляторов эндотелия (NO). Кроме того, окислительный стресс приводит к дальнейшей экспрессии и активации лейкоцитов, макрофагов, тучных клеток и Т-лимфоцитов. Цитокины экспрессируются лейкоцитами, что приводит к постоянной провоспалительной среде в дополнении к протеолитической активации матриксных металлопротеиназ, которые вызывают эндотелиально-гладкомышечную релаксацию, расширение венозной стенки, протеолитическую деградацию и образование хронических язв нижних конечностей [158, 168, 175, 176, 197]. При холодовой травме, в том числе, выражены процессы активации и дисфункции эндотелия и воспаления. При этом в очаг повреждения происходит миграция лейкоцитов, и как следствие секреция и повышение активности ММР, молекул адгезии, цитокинов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что желатиназы (ММР-2, ММР-9) являются причиной затяжного течения раневого процесса при местной холодовой травме.

У пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИНК) наблюдается повышение концентрации в сыворотке крови ММР-1, ММР-2, ММР-8, ММР-9 и ММР-10. Данные изменения являются показателями прогнозирования неблагоприятных исходов у пациентов с КИНК [153]. Доказана также линейная корреляция между уровнями ММР-9 в плазме и тяжестью ишемии у пациентов с различной степенью заболеваний периферических артерий [105]. Таким образом, при гипоксии и ишемии в тканях развиваются вторичные изменения, обусловленные воспалением и высокими концентрациями ММР, что так же наблюдается при криоповреждении.

Кроме того, ММР-2 наряду с некоторыми другими ММР, могут ингибировать ангиогенез [16, 101] Это связывают с их способностью образовывать антиангиогенные полипептиды путем превращения плазминогена в ангиостатин, который угнетает пролиферацию и усиливает апоптоз клеток

эндотелия [43, 44]. Установлено, что MMP-2 имеет значительный ингибиторный эффект в отношении воспаления путем процессинга большинства хемокинов, в частности, провоспалительных интерлейкинов. Возможно, ингибирующее действие MMP-2 связано с нарастающей дисфункцией эндотелия и формированием значительного количества неблагоприятных цепных реакций, формируется своего рода защитная реакция организма на нарастающее перифокальное воспаление [28].

Известно, что уровень IL-1, IL-8, IL-12 и TNF α повышен во все периоды МХТ [1, 32, 74]. Однако в поздние сроки местной холодовой травмы уровень провоспалительных цитокинов снижается, но по-прежнему остается достоверно выше нормальных значений. При этом уровень MMP-9 остается стабильно высоким у пациентов с отморожениями. Синтез MMP-9 происходит в основном в макрофагах и тромбоцитах, реализующих свои функции в интерстициальном пространстве [43, 47]. При этом одной из особенностей MMP-9 является хемотаксис фибробластов в межклеточное пространство для реализации процессов репарации [48, 51, 53, 174]. С другой стороны, MMP-9 провоцирует десмоплазию коллагена [60, 89]. Ремоделирование коллагена в очаге поражения способствует дискоординации пролиферации и, как следствие, затяжному и неблагоприятному течению раневого процесса.

При исследовании роли молекул межклеточной адгезии в патогенезе холодовой травмы было выявлено их резкое повышение в позднем реактивном периоде, однако с незначительным снижением в периоде гранулирования и эпителизации. Наблюдалось так же нарастание уровня ICAM-1 и VCAM-1 с увеличением массива пораженных холодом тканей. Данный феномен объясняется воспалением и процессами эндотелиальной дисфункции как в ранние, так и в поздние сроки отморожений. Доказано, что и в отдаленные сроки с момента криоповреждения в крови пациентов уровень ICAM-1 и VCAM-1 превышает показатели здоровых лиц в 2 раза, и у таких пациентов чаще развиваются трофические язвы, облитерирующие поражения сосудов и повторное глубокое отморожении на фоне облитерирующего поражения артерий [94]. Следовательно,

можно с уверенностью сказать, что нарушение процессов репарации, регенерации и заживления, а также развития осложнений связаны с высоким уровнем в крови молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1.

Приведенные показатели подтверждают образование первичных продуктов ПОЛ в зоне альтерации после действия низких температур. Система ПОЛ-антиоксиданты у больных с местной холодовой травмой, очевидно, находится в состоянии динамического равновесия, при этом участвуя в биологически целесообразных механизмах очищения ран от продуктов некроза, подготовке к репарации и реализации эффекторных реакций защиты.

Таким образом, изменения процессов ПОЛ и антиоксидантной защиты у больных с местной холодовой травмой III-IV степени происходили в результате изначального влияния низких температур на ферментные системы зоны поражения, а также отражали последующие сдвиги локального кровообращения и тканевого обмена на фоне развития воспалительной реакции, изменения секреторной активности клеток эндотелия, состояния гемостаза и фибринолиза. В свою очередь, патологическая конформация процессов свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной защиты у пациентов с отморожениями могла являться фактором усугубления неблагоприятных сдвигов в функционировании различных систем защиты и адаптации в ответ на повреждение низкими температурами.

При изучении морфологических особенностей изменения тканей в зоне холодовой альтерации были выявлены некоторые закономерности. Наиболее чувствительными к действию холода оказались кожа, мышечная, костная, хрящевая ткани, кровеносные сосуды. В этих структурах наблюдались выраженные воспалительные, дистрофические, некротические изменения, которые обусловлены непосредственным действием низких температур на ткани, а также поражением сосудов, сопровождающимся вторичным ишемическим повреждением вышеуказанных тканей. Эндотелиальные клетки сосудов, из-за высокой дифференцировки максимально чувствительны к любому повреждению [21]. Следовательно, описанные изменения являются необратимыми, так как

сопровождается некрозом тканей, в связи с их потребностью в интенсивном кровоснабжении.

Доказано, что ММР-2 вырабатывается в фибробластах, а также нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [101]. Источниками ММР-9 являются кератиноциты, моноциты, лейкоциты [120], то есть клетки соединительной ткани. При отморожениях первыми поражаются кожа с подлежащими тканями, где экспрессируется максимальное количество металлопротеиназ, что способствует разрушению экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани, развитию некроза, и в последующем хронизации воспалительного процесса в зоне холодной альтерации.

В норме заживление раны представляет собой четкую последовательность биологических и молекулярных процессов, начиная с миграции и пролиферации клеток, перестройки экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и заканчивая ремоделированием вновь формирующихся тканей. Без своевременного и точного клеточного ответа на медиаторы воспаления, факторы роста и цитокины невозможна эффективная репарация [115, 122, 125].

В ходе заживления рана проходит следующие фазы: коагуляции, воспаления, миграции-пролиферации (включая перестройку матрикса) и ремоделирования. При острых ранах в каждую фазу биологические и клеточные процессы идут параллельно, что отсутствует в хронических. Некоторые участки хронической раны одновременно могут находиться в различных фазах заживления, процессы перехода от одной фазы к другой разобщены [30, 179, 180, 181, 187, 190, 193, 200].

Доказано, что у пациентов с СД снижается количество продуцируемого фибробластами коллагена, что ведет к замедлению сокращения раны. Также нарушение углеводного обмена влечет за собой повышение матриксных металлопротеиназ (ММР) и снижение оксида азота (NO), трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF β 1), что является причиной замедления процессов формирования экстрацеллюлярного матрикса [30]. Y. Liu по результатам проведенного исследования делает вывод, что высокий уровень ММР-9 в раневой

жидкости свидетельствует о воспалении и является маркером плохого заживления ран при СД [143].

Вероятно, что высокий уровень коллагеназ в поздние сроки с момента холодовой травмы и обуславливает затяжное течение раневого процесса и увеличивает риск осложнений и отдаленных последствий отморожений.

Менее чувствительны к действию холода оказались кожные дериваты и нервы, расположенные в дерме. Это связано с особенностями кровоснабжения кожи, которое осуществляется двумя артериальными и венозными сплетениями: поверхностными и глубокими. Поверхностный располагается в сосочках дермы, а глубокий в гиподерме. В связи с этим, находящиеся между сплетениями сальные, потовые железы, волосяные фолликулы и нервы имеют скудное кровоснабжение и, следовательно, слабее подвергаются изменениям. В них наблюдаются очаговые дистрофические изменения, которые несут обратимый характер.

Особое место в развитии раневого процесса при отморожениях занимают поражения кровеносных сосудов. Среди механизмов развития деструкции при отморожениях важное место занимают процессы альтерации эндотелия с его дисфункцией [21]. Дисфункция эндотелия и, как следствие, нарушения гемостаза у пациентов с местной холодовой травмой сохраняются в течение длительного срока, что отражается в негативном течении раневого процесса и наличии трофических нарушений [21, 98].

При отморожениях в стенках артерий в течение длительного времени поддерживается воспалительный процесс, вызванный повреждением эндотелия. И как следствие, развитие эндартериита, эндофлебита и тромбофлебита, что в свою очередь ведет к разрастанию соединительной ткани в стенках, сужению просвета сосудов, что еще больше усугубляет ишемию тканей зоны холодовой альтерации. Наличие распространенных тромбов так же свидетельствует о повреждении эндотелия и нарушениях в системе гемостаза, что ведет к значительным сдвигам свертывающей системы крови, фибринолиза и нарушения тканевого обмена [21].

Таким образом, после проведенных исследований морфологических изменений тканей и изучения уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови у пациентов с местной холодовой травмой конечностей, можно проследить некоторые закономерности.

Повреждение тканей при отморожениях происходит вследствие как непосредственного действия низких температур на ткани, так и в связи с развитием гипоксии и ишемии после согревания пораженных конечностей. В ходе наших исследований выявлено, что уровень MMP-2 и MMP-9 повышается в позднем реактивном периоде и остается на высоких значениях в периоде гранулирования и эпителизации. Это обусловлено миграцией в очаг поражения большого количества клеток фибробластов, лейкоцитов, макрофагов и моноцитов, которые активно продуцируют данные желатиназы, тем самым поддерживая длительное время воспалительный процесс в тканях зоны криоповреждения. Металлопротеиназы ингибируют ангиогенез в зоне альтерации, что также является причиной затяжного течения раневого процесса. Кроме этого, у пациентов с отморожениями повышается уровень молекул межклеточной адгезии в сыворотке крови ICAM-1, VCAM-1, что так же является предиктором продолжительного течения раневого процесса.

При проведении морфометрических исследований по изменению компонентов внеклеточного матрикса, а именно коллагеновых волокон, были выявлены некоторые особенности. Установлено, что у пациентов с местной холодовой травмой отмечается изменение толщины и ориентации коллагеновых волокон в поздние сроки криоповреждения. Данные изменения хорошо коррелируют с уровнем в крови пациентов желатиназ и их ингибиторов, молекул адгезии. Установлена сильная прямая зависимость между вышеуказанными показателями.

Таким образом, данный феномен доказывает участие матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и молекул межклеточной адгезии в репаративных процессах при криотравме, а именно, является фактором усугубления течения раневого процесса при холодовой альтерации.

В рамках нашего исследования проведен анализ корреляционных взаимодействий между уровнем в сыворотке крови матриксных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-9), тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ТИМР-1, ТИМР-2) и молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1). Выявлено, что наиболее тесная связь наблюдалась между ММР-2, ММР-9, ICAM-1 и VCAM-1. Данный феномен объясняется наличием общих механизмов, способствующих их продукции, таких как воспаление, активация и дисфункция эндотелия, непосредственное действие низких температур на ткани, что подтверждает сильную корреляционную зависимость.

Среди показателей ПОЛ-АОС также проведено изучение взаимосвязей. Выявлено, что наиболее тесная связь при отморожениях наблюдается у ДК с КД и СТ обеих фаз и каталазной активности эритроцитов, а также у показателей в изопропанольной фазе в исследуемых группах по уровню поражения. При этом между ДК с КД и СТ изопропанольной и гептановой фаз отмечалась положительная корреляционная связь, а с каталазной активностью эритроцитов наблюдалась обратная отрицательная связь. Это говорит о том, что показатели ПОЛ-АОС в процессе развития патологических изменений при местной холодовой травме также повышаются относительно контроля и находятся в состоянии равновесия, одновременно участвуя в механизмах очищения ран от продуктов некроза, подготовке к репарации и реализации эффекторных реакций защиты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе на основании исследования роли матриксных металлопротеиназ 2 и 9 и их ингибиторов, молекул межклеточной адгезии и системы ПОЛ-антиоксиданты в воспалительных реакциях при криотравме решена актуальная научно-практическая задача. Положения, выносимые на обсуждение доказаны и подтверждаются полученными результатами исследования.

В работе изучены механизмы влияния желатиназ на течение воспалительных реакций и раневого процесса у пациентов с криоповреждением. Доказано, что существует прямая связь между концентрацией их в сыворотке крови, тяжестью повреждения и зависимостью от масштаба поврежденных тканей. Уровень эндопептидаз повышается и остается высоким в ранние и поздние сроки с момента получения холодового поражения. Развивается значительный сбой в ремоделировании внеклеточного матрикса за счет деструкции коллагеновых волокон, репарации тканей и ангиогенезе, что приводит к затяжному течению репаративных процессов. В тканях длительное время поддерживается воспалительный процесс, что ведет к замедлению сроков заживления. Отмечается повышение концентрации в сыворотке крови молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и активация процессов перекисного окисления липидов, что является усугубляющим фактором воспалительных реакций и течения раневого процесса при холодовой альтерации. Выявлены закономерности морфологических изменений в тканях зоны криоповреждения в зависимости от уровня MMP-2, MMP-9. Чем выше концентрация в сыворотке крови металлопротеиназ, адгезивных молекул, продуктов ПОЛ, тем выраженнее в тканях развиваются воспалительные, некротические и дистрофические процессы. Резюмируя изложенное, ниже представлена схема патогенеза течения раневого процесса при МХТ (Рисунок 4.2).

В результате диссертационного исследования решена одна из актуальных на сегодняшний день проблем патогенеза холодовой травмы. Полученные результаты позволяют расширить представления о механизмах влияния низких температур на организм человека, а также улучшить комплексные подходы к терапии пострадавших, снижению риска осложнений, сокращению пребывания в стационаре, снижению летальности, стоимости лечения и процента инвалидизации.

Примененные методы исследования, а именно метод иммуноферментного анализа с помощью диагностического планшета LEGENDplex™ фирмы BioLegend позволил точно определить содержание уровня металлопротеиназ и их ингибиторов, и молекул межклеточной адгезии в сыворотке крови у пациентов с местной холодовой травмой. Данную методику в перспективе можно использовать для прогнозирования течения воспалительных и репаративных процессов при отморожениях.

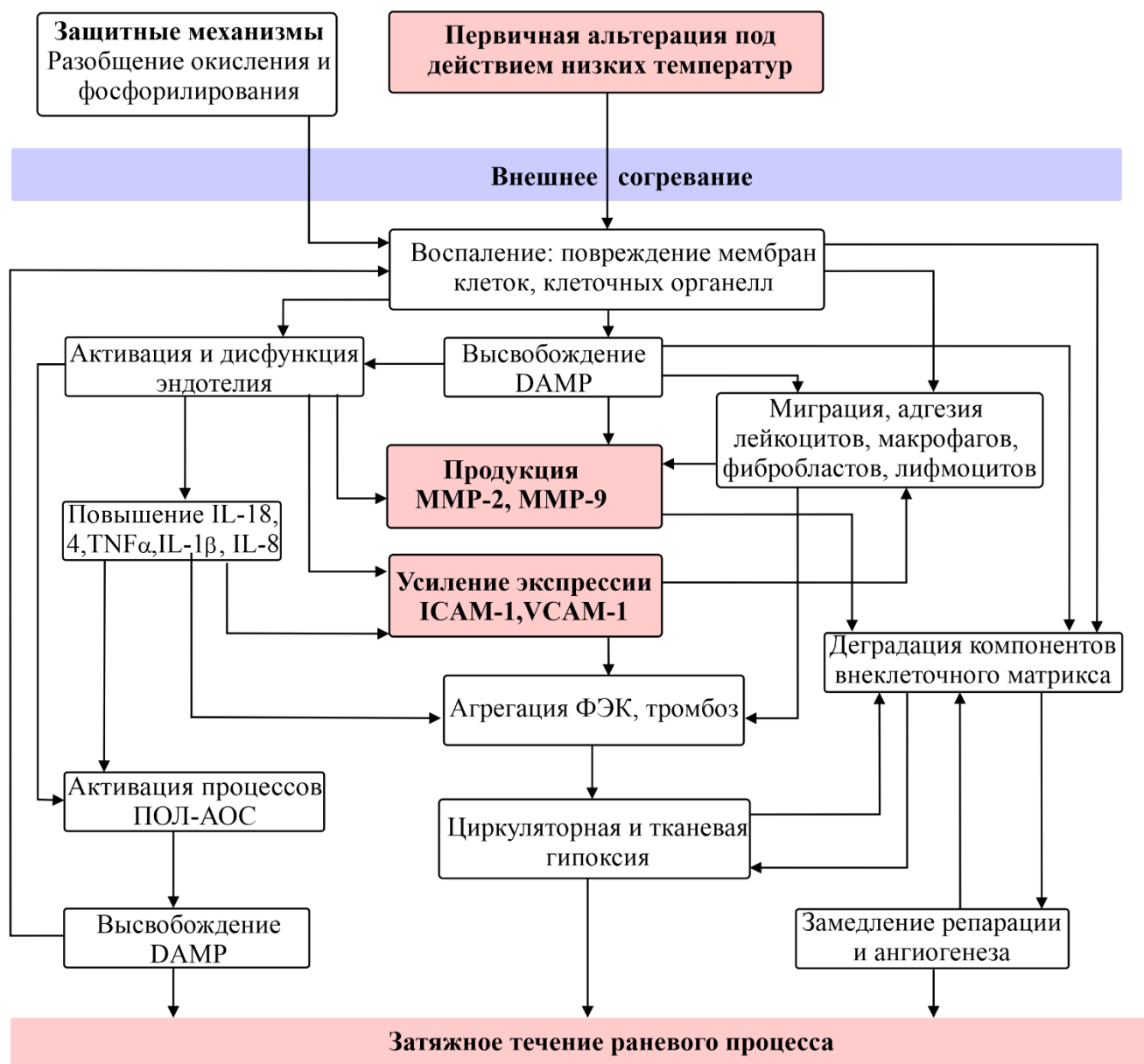


Рисунок 4.2 Схема патогенетических механизмов при криотравме

ВЫВОДЫ

1. При местной холодовой травме в крови пациентов возрастает уровень матриксных металлопротеиназ 2 и 9, молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1). Уровень желатиназ увеличивается при усугублении тяжести травмы, содержание их ингибиторов значительно повышено во все периоды отморожения. На 5 сутки после криотравмы уровень в кровотоке ICAM-1 в 22,6 раза, на 30 сутки – в 6,3 раза выше показателей контроля, концентрация VCAM-1 повышается на 5 сутки в 1,9 раза, на 30 сутки не отличается от контроля.

2. У пациентов с отморожениями уровень диеновых конъюгат повышается в среднем в 2,5 раза, кетодиенов и сопряженных триенов в 2,2 раза. Отмечается снижение коэффициента E232/E220 в 2,6 раза, E278/E220 в 2,4 раза. В гептановой фазе уровень диеновых конъюгат повышается в 21 раз, кетодиенов и сопряженных триенов в 3,7 раза, уровень коэффициента E232/E220 не меняется, а E278/E220 снижается в 12 раз. Уровень ТБК-активных продуктов в эритроцитах повышается на 20%, а каталазная активность в эритроцитах снижается на 11%. Значимой динамики общей антиоксидантной активности не регистрируется.

3. При отморожениях III-IV степени в тканях, окружающих зону некроза, на 30 сутки изменяется толщина и ориентация коллагеновых волокон. Степень повреждения волокон зависит от уровня в крови MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2. Установлена сильная прямая корреляционная взаимосвязь между уровнем в крови матриксных металлопротеиназ (MMP-2 и MMP-9) и молекул межклеточной адгезии (ICAM-1 и VCAM-1), сильная прямая корреляционная взаимосвязь между толщиной коллагеновых волокон и уровнем в крови матриксных металлопротеиназ (MMP-2 и MMP-9).

4. Прогностическими факторами уровня повреждения тканей и течения раневого процесса при местной холодовой травме нижних конечностей являются высокие значения показателей MMP-2, MMP-9, ICAM-1, VCAM-1 и TIMP-2 в сыворотке крови на 5 сутки после криотравмы.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Кроме рассмотренных в данной работе матричных металлопротеиназ и их ингибиторов, молекул межклеточной адгезии, системы ПОЛ-антиоксиданты, по нашему мнению, целесообразно оценить роль металлопротеиназ других групп (коллагеназы, стромелизины, мембрано-связанные металлопротеиназы), отвечающих за вторичную альтерацию тканей при отморожениях. Перспективы дальнейшего исследования проблемы заключаются в подробном изучении отдельных звеньев патогенеза местной холодовой травмы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC	Area Under Curve (площадь под кривой)
DAMP	Molecular patterns associated with damage (Молекулярные паттерны, связанные с повреждением)
GRID	Матрица со значениями исследуемого параметра
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (молекула межклеточной адгезии 1)
IL-1	Interleukin 1 (Интерлейкин 1)
IL-12	Interleukin 12 (Интерлейкин 12)
IL-8	Interleukin 8 (Интерлейкин 8)
MMP	Matrix metalloproteinases
TNF α	Tumour necrosis factor α (Фактор некроза опухоли)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (молекула адгезии сосудистых клеток-1)
АОС	Антиоксидантная система
ВКМ	Внутриклеточный матрикс
ГИС	Геоинформационные системы
ДК	Диеновые конъюгаты
КД	Кетодиены
КИНК	Критическая ишемия нижних конечностей
КК	Коэффициент кривизны
МДА	Малоновый диальдегид
ММР	Матриксные маталлопротеиназы
МХТ	Местная холодовая травма
ОАА	Общая антиоксидантная активность
ПГЭ	Период гранулирования и эпителизации
ПВК	Пировиноградная кислота

ПОЛ	Перекисное окисление липидов
ПРП	Поздний реактивный период
ПМ ₁	Прогностическая модель на основе показателей матричных металлопротеиназ, их ингибиторов и активности молекул межклеточной адгезии
ПМ ₂	Прогностическая модель на основе системы ПОЛ-АОС
РРП	Ранний реактивный период
СТ	Сопряженные триены
ТБК	Тиобарбитуровая кислота
TIMP	Тканевой ингибитор матричных металлопротеиназ
ТХУ	Трихлоруксусная кислота
ХОБЛ	Хроническая обструктивная болезнь легких
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭЦМ	Экстрацеллюлярный матрикс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев А.А. Диагностика и лечение отморожений (клинические рекомендации) / А.А. Алексеев, Р.З. Алексеев, К.Г. Шаповалов [и др.]. – URL: <http://combustiolog.ru/wp-content/uploads/2013/07/Diagnostika-i-lechenieotmorozenij-2017.pdf> (дата обращения: 09.10.2020).
2. Алексеев Р.З. Комплексное лечение отморожений в дореактивном периоде: специальность 14.00.22 «Травматология-ортопедия»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Алексеев Рево Захарович; Якутский медицинский институт при Якутском государственном университете имени М. К. Аммосова. – Москва, 1999. – 30 с. – Место защиты: Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова.
3. Алексенко Е.Ю. Показатели перекисного окисления липидов и антирадикальной защиты у больных остеоартрозом / Е.Ю. Алексенко, А.В. Говорин // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009. – № 4 (32). – С. 33-36.
4. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
5. Аникина, Л. В. Криомедицина: плюсы и минусы. Часть 2. характеристика физиологических и патогенетических механизмов действия системы «охлаждение – замораживание – оттаивание» / Л. В. Аникина // Забайкальский медицинский вестник. – 2017. – № 2. – С. 185-195. – DOI 10.52485/19986173_2017_2_185
6. Арьев Т.Я. Отморожение. Патологическая анатомия, патологическая физиология, патогенез, клиника, профилактика, лечение / Т.Я. Арьев. – Ленинград: Государственное издательство медицинской литературы, 1938. – 204 с.
7. Атлас термических поражений / В.А. Сизоненко, К.Г. Шаповалов, А.М. Мироманов, С.А. Сумин. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 74 с. – ISBN 978-5-9704-3853-4.

8. Базарбанин Б.Ж. Клинико-морфологические особенности местной холодовой травмы за период 2012-2016 годы по данным ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» / Б.Ж. Базарбанин, А.С. Роик, О.С. Лин-Фа // Медицина завтрашнего дня: материалы XVI межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых: сборник научных трудов, г. Чита, 18-21 апреля 2017 г. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2017. – С. 87-88.

9. Базарбанин Б.Ж. Морфологические особенности отморожений по данным биопсий ожогового отделения ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» / Б.Ж. Базарбанин, А.С. Роик, К.С. Дверник // Медицина завтрашнего дня: материалы XVII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 65-летию Читинской государственной медицинской академии: сборник научных трудов, г. Чита, 17-20 апреля 2018 г. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2018. – С. 76-77.

10. Васина Л.В. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры / Л.В. Васина, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов. – DOI 10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15 // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – № 16 (1). – С. 4-15.

11. Виткина Т.И. Характер межсистемных взаимодействий при хроническом бронхите в различных экологических условиях // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 14, № 1. – С. 175-178.

12. Вихриев Б.С. Местные поражения холодом / Б.С. Вихриев, С.Х. Кичемасов, Ю.Р. Скворцов. – Ленинград: Медицина, 1991. – 192 с. – ISBN 5-225-01376-7.

13. Воинов А.И. Клиническая классификация холодовых травм и прогнозирование глубины поражения тканей в остром периоде // Клиническая хирургия. – 1989. – № 12. – С. 41-43.

14. Воинов А.И. Отморожения конечностей / А.И. Воинов. – Минск: Маладняк, 1995. – 142 с. – ISBN 985-6205-02-6.

15. Волощенко К.А. Проблемы оказания медицинской помощи поражённым с глубокими отморожениями конечностей в дореактивном периоде /

К.А. Волощенко // Холодовая травма: III научная конференция по проблеме: сборник тезисов. – Санкт-Петербург, 2002. – С. 20-21.

16. Ганусевич И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей / И.И. Ганусевич // Онкология. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 108-117.

17. Головченко Ю.И. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции / Ю.И. Головченко, М.А. Трещинская // Consilium medicum Ukraina. – 2008. – № 11. – С. 38-40.

18. Гржибовский А.М. Анализ биомедицинских данных с использованием пакета статистических программ SPSS: учебное пособие / А.М. Гржибовский, Т.Н. Унгурияну. – Архангельск: СГМУ, 2017. – 293 с. – ISBN 978-5-91702-255-0.

19. Гржибовский А.М. Анализ номинальных и ранговых переменных данных с использованием программного обеспечения STATISTICA и SPSS / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 6. – С. 5-39.

20. Груздева О.С. Активность процессов липопероксидации при глубоких отморожениях в зависимости от массива пораженных тканей / О.С. Груздева, М.И. Михайличенко // Современные проблемы анестезиологии и реаниматологии: сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием, г. Чита, 29-30 апреля 2020 г. / под общей редакцией К.Г. Шаповалова. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2020. – С. 32-38.

21. Груздева О.С. Морфологические особенности изменения тканей при отморожениях конечностей / О.С. Груздева, М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов. – DOI 10.52485/19986173_2022_1_104 // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2022. – № 1. – С. 104-113. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-1-za-2022-god/morfologicheskie-osobennosti-izmenenija-tkanej-pri-otmorozhenijah-konechnostej> (дата обращения: 20.11.2022).

22. Груздева О.С. Особенности течения и исходы при местной холодовой травме конечностей / О.С. Груздева, М.И. Михайличенко // Современные проблемы анестезиологии и реаниматологии: сборник научных трудов Всероссийской конференции, г. Чита, 17-18 апреля 2019 г. / под общей редакцией К.Г. Шаповалова. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2019. – С. 23-25.

23. Груздева О.С. Патологическая анатомия отморожений / О.С. Груздева. – DOI 10.52485/19986173_2020_4_137 // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2020. – № 4. – С. 137-144. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2020-god/patologicheskaja-anatomija-otmorozhenij> (дата обращения: 15.02.2020).

24. Груздева О.С. Состояние систем перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у больных в разных периодах местной холодовой травмы конечностей / О.С. Груздева, К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко. – DOI 10.35177/1994-5191-2020-4-5-10 // Дальневосточный медицинский журнал. – 2020. – № 4. – С. 5-10.

25. Динамика матриксных металлопротеиназ при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, О.С. Груздева // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2019. – Т. 4, № 5. – С. 79-83.

26. Динамика молекул межклеточной адгезии и ассиметричного диметиларгинина при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2021. – № 2. – С. 70-79.

27. Динамика уровня миелопероксидазы и сывороточного кальпротектина при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, О.С. Груздева. – DOI 10.29413/ABS.2020-5.3.3 // Acta biomedica scientifica. – 2020. – № 5 (3). – С. 24-28.

28. Долганова Т.И. Метаболизм тканей кисти и функциональные резервы микроциркуляции у пациентов с последствиями экстремального воздействия холодового фактора при лечении по Илизарову / Т.И. Долганова, Д.А. Шабалин,

Д.В. Долганов. – DOI 10.18019/1028-4427-2017-23-4-460-466 // Гений ортопедии. – 2017. – № 23 (4). – С. 460-466.

29. Зависимость активности ммп в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса / М.В. Протасов, Л.В. Смагина, О.В. Галибин [и др.] // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 10. – С. 882-886.

30. Зайцева Е.Л. Роль факторов роста и цитокинов в репаративных процессах в мягких тканях у больных сахарным диабетом / Е.Л. Зайцева, А.Ю. Токмакова. – DOI 10.14341/DM2014157-62 // Сахарный диабет. – 2014. – № 1. – С. 57-62.

31. Зиновьев А.Р. Анализ ранних и поздних осложнений отморожений по данным ГУЗ «Городская клиническая больница №1» / А.Р. Зиновьев, К.А. Ничипорук, А.С. Утюжников // Медицина завтрашнего дня: материалы XVIII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых: сборник научных трудов, Чита, 23-26 апреля 2019 г. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2019. – С. 94-95.

32. Значение матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в течении раневого процесса при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, О.С. Груздева // Якутский медицинский журнал. – 2020. – № 2 (70). – С. 72-76.

33. Значение эндотелиальной дисфункции в патогенезе локальной холодовой травмы / Ю.С. Винник, М.Ю. Юрьева, О.В. Теплякова [и др.] // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2014. – Т. 22, № 31. – С. 2204-2206.

34. Интенсивная терапия местной холодовой травмы у детей / К.Г. Шаповалов, В.А. Сизоненко, В.В. Ковалев [и др.] // Детская хирургия. – 2009. – № 1. – С. 36-38.

35. Капитонов В.М. «Окислительный стресс» и его коррекция у больных с тяжелой сочетанной травмой / В.М. Капитонов, Д.А. Остапченко // Общая реаниматология. – 2010. – Т. 6, № 4. – С. 70-75.

36. Капралов Е.Г. Основы геоинформатики: в 2 книгах / Е.Г. Капралов, А.В. Кошкарёв, В.С. Тикунов; под редакцией В.С. Тикунова. – Москва: Академия, 2004. – 480 с. – ISBN 5-7695-1443-4.

37. Кардовский А. Г. Лечение пострадавших с тяжелой местной холодовой травмой в остром периоде / А. Г. Кардовский // Вятский медицинский вестник. – 2021. – № 1(69). – С. 19-25. – DOI 10.24411/2220-7880-2021-10145.

38. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза / Н.В. Безручко, Г.К. Рубцов, Н.Б. Ганяева [и др.] // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2012. – № 7 (122). – С. 94-99.

39. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матричных металлопротеиназ в норме и при патологии / А.С. Шадрина, Я.З. Плиева, Д.Н. Кушлинский [и др.]. – DOI 10.18786/2072-0505-2017-45-4-266-279 // Альманах клинической медицины. – 2017. – Т. 45 (4). – С. 66-79.

40. Клишо Е.В. Матричные металлопротеиназы в онкогенезе / Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов // Сибирский онкологический журнал. – 2003. – № 2. – С. 63-70.

41. Козинец Г.П. Замерзание: патогенез, лечение / Г.П. Козинец, Г.Ф. Олейник, В.П. Цыганков // Медицина неотложных состояний. – 2012. – Т. 5, № 44. – С. 24-28.

42. Колесов В.В. Математика для медицинских вузов: учебное пособие / В.В. Колесов. – Москва: Феникс, 2015. – 379 с. – ISBN 978-5-222-23522-5.

43. Коннов В.А. Содержание медиаторов иммунного ответа в плазме больных с местной холодовой травмой при исходной недостаточности питания / В.А. Коннов, К.Г. Шаповалов // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – № 11 (5). – С. 34-39.

44. Коррекция триметазидином эндотелиальной дисфункции при АДМА-подобной преэклампсии / О.Е. Анциферова, А.В. Юракова, Т.И. Локтева [и др.] // Смоленский медицинский альманах. – 2018. – № 4. – С. 174-175.

45. Котельников В.П. Отморожения / В.П. Котельников. – Москва: Медицина, 1988. – 256 с. – ISBN 5-225-00163-7.

46. Красько О.В. Статистический анализ данных в медицинских исследованиях: учебно-методическое пособие: в 2 ч. Ч. I / О.В. Красько. – Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2014. – 127 с.

47. Крупаткин А.И. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем. Колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. – Москва: ЛИБРОКОМ, 2013. – 496 с. – ISBN 978-5-9710-7795-4.

48. Кузник Б.И. Лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарные взаимоотношения в различных бассейнах сосудистого русла у больных хронической формой ИБС / Б.И. Кузник, Ю.А. Витковский, А.В. Солпов // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2012. – № 2. – С. 92-100. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-2-za-2012-god/lejkocitarno-trombocitarno-jeritrocitarnye-vzaimootnoshenija-v-razlichnyh-bassejnah-sosudistogo-rusla-u-bolnyh-hronicheskoy-formoj-ibs> (дата обращения: 01.03.2019).

49. Курлович Д.М. ГИС-анализ и моделирование / Д.М. Курлович. – Минск: БГУ, 2016. – 24 с.

50. Лебедь А.А. Социальные аспекты холодовой травмы / А.А. Лебедь, А.А. Брегадзе, К.К. Шильников // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2010. – № 1 (29). – С. 69-71.

51. Локальная холодовая травма: вопросы патогенеза, оценки тяжести и лечения (обзор литературы) / Ю.С. Винник, А.Б. Салмина, М.Ю. Юрьева, О.В. Теплякова // Московский хирургический журнал. – 2011. – № 1 (17). – С. 42-48.

52. Маковеев С.А. Частота, структура и исходы гипотермии у взрослых пациентов при поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии: многоцентровое ретроспективное исследование // Анестезиология и реаниматология. – 2019. – № 4. – С. 31-37.

53. Малолина Е.А. Создание модели сокультивирования сертоли-подобных клеток мыши со сперматогониальными клетками / Е.А. Малолина, А.Ю. Кулибин // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2019. – № 2. – С. 133-138. – URL: <http://www.iramn.ru/journal/ktbm/2019/ktbm1902.htm> (дата обращения: 12.03.2020).

54. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и паталогических процессах (обзор) / Л.Н. Рогова, Н.В. Шестернина, Т.В. Замечник, И.А. Фастова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, №2. – С. 86.

55. Мельникова Ю.С. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней / Ю.С. Мельникова, Т.П. Макарова. – DOI 10.17750/KMJ2015-659 // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 4. – С. 659-665.

56. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

57. Методология и практика анализа данных в медицине: монография / И.А. Левин, И.Б. Манухин, Ю.Н. Пономарева, В.Г. Шуметов. – Москва: Тель-Авив. АПЛИТ, 2010. – 201 с.

58. Методы статистической обработки медицинских данных: методические рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников / составители: А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, В.П. Масенко [и др.]. – Москва: РКНПК, 2012. – 42 с.

59. Михайличенко М.И. Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с холодовой травмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, Ю.А. Витковский // Забайкальский медицинский вестник. – 2006. – № 3. – С. 19-21.

60. Михайличенко М.И. Микроциркуляторные нарушения в патогенезе местной холодовой травмы / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов. – DOI

10.24884/1682-6655-2019-18-2-4-11 // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2019. – № 18 (2). – С. 4-11.

61. Москалец О. В. Молекулы межклеточной адгезии как биомаркеры тяжелой инфекционной патологии / О. В. Москалец // Наука и инновации - современные концепции: сборник научных статей по итогам работы Международного научного форума, Москва, 04 июня 2021 года. – Москва: Инфинити, 2021. – С. 159-162.

62. Москалец, О. В. Молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 при инфекционной патологии / О. В. Москалец // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2018. – № 2(72). – С. 21-25. – DOI 10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.21-25.

63. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2020. – № 2. – С. 151-163. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-1-za-2020-god/algoritmy-statisticheskogo-analiza-kachestvennyh-priznakov-v-biomedicinskih-issledovaniyah-s-pomoshhju-paketa-programm-spss> (дата обращения: 15.02.2022)

64. Наследов А.Д. SPSS 19. Профессиональный статистический анализ данных / А.Д. Наследов. – Санкт-Петербург: Питер, 2011. – 399 с. – ISBN 978-5-459-00344-4.

65. Николаев В.М. Интенсивность свободнорадикального окисления липидов в организме больных холодовой травмой / В.М. Николаев, Р.З. Алексеев, С.А. Федорова. – DOI 10.25789/УМЖ.2018.62.11 // Якутский медицинский журнал. – 2018. – № 2 (62). – С. 34-38.

66. Определение активности каталазы эритроцитов как показателя антиоксидантной защиты организма лабораторных животных при воздействии пятиокси ванадия / Л.Н. Самыкина, О.Я. Сказкина, Н.И. Дроздова, И.М. Ибрагимов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1 (6). – С. 1497-1502.

67. Особенности нарушений микроциркуляции и межклеточных взаимодействий при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г.

Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 11-17.

68. Отморожение. Гипотермия. Другие эффекты воздействия низкой температуры // Общероссийская общественная организация «Объединение комбустиологов» «Мир без ожогов»: [сайт]. – 2021. – URL: <http://combustiolog.ru/> (дата обращения 22.11.2021).

69. Пекарский Д.Е. Клинико-иммунологические обоснования лечебной тактики при локальных холодовых травмах в дореактивном периоде / Д.Е. Пекарский, О.М. Захаренко // II научная конференция по проблеме «Холодовая травма»: сборник тезисов, 6-7 апр., г. Ленинград. – Ленинград, 1989. – С. 65-66.

70. Перекисное окисление липидов в дореактивном периоде холодовой травмы / В.М. Николаев, С.И. Софронова, Е.К. Румянцев [и др.]. – DOI 10.29413/ABS.2020-5.2.1 // Acta biomedica scientifica. – 2020. – № 5 (2). – С. 7-11.

71. Петрищев Н.Н. Физиология и патофизиология эндотелия / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов // Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция: сборник. – Санкт-Петербург: Изд-во СПбГМУ, 2003. – С. 4-38. – ISBN 5-88999-044-6 (в пер.).

72. Попов В.Г. Холодовая травма и последствия ее в условиях Крайнего Севера // Дальневосточный медицинский журнал. – 1998. – № 3. – С. 7-12.

73. Предупреждение развития некроза при отморожениях с оледенением тканей / Р.З. Алексеев, М.И. Томский, А.С. Гольдерова [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 8-1. – С. 35-41.

74. Роль лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, цитокинов и эндотелиальной дисфункции в патогенезе повреждения холодом / К.Г. Шаповалов, Е.А. Томина, М.И. Михайличенко, Ю.А. Витковский // Патофизиология и экспериментальная терапия. – 2009. – № 1. – С. 39-40.

75. Савельев А.А. Основы пространственного анализа в растровых ГИС: учебно-методическое пособие / А.А. Савельев, С.С. Мухарамова, Н.А. Чижикова. – Казань, 2015. – 59 с.

76. Сепп А.В. Ферменты азурофильных гранул нейтрофилов и матриксная металлопротеиназа 2 как маркеры стадий экспериментального респираторного дистресс-синдрома / А.В. Сепп, Е.В. Пруткина, Н.Н. Цыбиков // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2014. – № 1. – С. 48-52.
77. Сизоненко В.А. Холодовая травма / В.А. Сизоненко. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 324 с.
78. Сизоненко В.А. Холодовая травма // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 4. – С. 98-101.
79. Скворцов Ю.Р. Комплексное консервативное лечение отморожений в раннем реактивном периоде. (Клинико-экспериментальное исследование): автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Скворцов Юрий Радиевич. – Ленинград, 1987. – 20 с.
80. Скворцов Ю.Р. Отморожения как вид боевой патологии: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Скворцов Юрий Радиевич. – Ленинград, 1998. – 40 с.
81. Смирнов С.В. Организация оказания экстренной помощи у больных с отморожениями / С.В. Смирнов // Методы оказания экстренной помощи больным с термической травмой: сборник научных трудов Московского городского НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского. Т. 76 / ответственный редактор Л.И. Герасимова. – Москва, 1988. – С. 30-33.
82. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции / Н.И. Соловьева // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 245-255.
83. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127-131.

84. Статистические методы в медицине и здравоохранении: учебное пособие / Н.Х. Шарафутдинова, Э.Ф. Киреева, И.Е. Николаева [и др.]. – Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018. – 131 с.

85. Сумин С.А. Экстренные и неотложные состояния: учебное пособие для подготовки кадров высшей квалификации / С.А. Сумин, К.Г. Шаповалов. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2019. – 624 с.

86. Терапевтическая гипотермия: возможности и перспективы / Е.В. Григорьев, Д.Л. Шукевич, Г.П. Плотников, Н.С. Тихонов // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 92, № 9. – С. 9-16.

87. Термоизоляция пораженных тканей как профилактика некрозов при Холодовых поражениях в вооруженных конфликтах / М.Г. Карайланов, А.М. Шелепов, В.О. Сидельников [и др.] // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008. – № 1(21). – С. 70-73.

88. Унгурияну Т.Н. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях / Т.Н. Унгурияну, А.М. Гржибовский // Экология человека. – 2011. – № 5. – С. 55-60.

89. Филипповская Ж.С. Оксидантный стресс и ранние осложнения послеоперационного периода в кардиохирургии / Ж.С. Филипповская, О.Н. Герасименко, О.А. Гребенчиков [и др.] // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2016. – № 6. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/oksidantnyy-stress-i-rannie-oslozhneniyaposleoperatsionnogo-perioda-v-kardiohirurgii> (дата обращения: 06.03.2018).

90. Холодовая травма / А.В. Хапкина, Ю.В. Карасева, С.С. Киреев [и др.]. – DOI 10.12737/25081 // Вестник новых медицинских технологий: электронное издание. – 2017. – № 1. – URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2017-1/2-14.pdf> (дата обращения: 15.11.2021).

91. Черешнев В.А. Патофизиология: учебник / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков. – Москва: Вече, 2001. – 693 с. – ISBN 5-7838-0999-3.

92. Чичков О.В. Медико-биологическое обоснование возможности электрофизиологического метода экспресс-диагностики глубоких отморожений /

А.В. Коваленко, О.В. Чичков, В.А. Сидоренко [и др.] // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2009. – № 4. – С. 15-19.

93. Шакиров Б.М. Наш опыт лечения местной холодовой травмы конечностей / Б.М. Шакиров, К.Р. Тагаев // Вестник экстренной медицины. – 2017. – Т. X (1). – С. 29-32.

94. Шапкин Ю.Г. Эндотелиальная дисфункция в отдаленном периоде холодовой травмы / Ю.Г. Шапкин, П.К. Гамзатова, Н.Ю. Стекольников // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2014. – № 4. – С. 359-363.

95. Шаповалов К.Г. Оптимизация компонентов регуляции сосудистого тонуса и состояния микроциркуляторного гемостаза на фоне продленной регионарной блокады при местной холодовой травме / К.Г. Шаповалов, Е.Н. Бурдинский, А.В. Степанов // Анестезиология и реаниматология. – 2008. – № 3. – С. 20-21.

96. Шаповалов К.Г. Отморожения в практике врача анестезиолога-реаниматолога // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2019. – Т. 16, № 1. – С. 63-68.

97. Шаповалов К.Г. Патогенетические механизмы местной холодовой травмы: специальность 14.00.16 «Патологическая физиология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Шаповалов Константин Геннадьевич; Читинская государственная медицинская академия. – Чита, 2009. – 39 с.

98. Шаповалов К.Г. Роль дисфункции эндотелия в альтерации тканей при местной холодовой травме // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – № 4. – С. 26-30.

99. Шихов А.Н. Геоинформационные системы: методы пространственного анализа / А.Н. Шихов, Е.С. Черепанова, С.В. Пьянков. – Пермь: Издательство ПГНИ, 2017. – 92 с.

100. Эффективность природных антиоксидантов при адаптации организма к холоду / Е.Ю. Юртаева, В.А. Доровских, Н.В. Симонова [и др.]. – DOI

10.12737/article_58e453527d0fc8.57228180 // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 63. – С. 70-74.

101. Ярмолинская М.И. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия / М.И. Ярмолинская, А.С. Молотков, В.М. Денисова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, выпуск 1. – С. 113-125.

102. Яровой Г.А. Исследование показателей липидного обмена и перекисного окисления липидов: методические рекомендации ЦОЛИУВ / Г.А. Яровой. – Москва, 1987. – 24 с.

103. Ярыгина Е.Г. Окислительный стресс и его коррекция карнозином / Е.Г. Ярыгина, В.Д. Прокопьева, Н.А. Бохан // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 4. – С. 106-113.

104. Gruzdeva O.S. Clinical and morphological characteristics of local cold injuries / O.S. Gruzdeva // Медицина завтрашнего дня : материалы XVIII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 23-26 апреля 2019 г., г. Чита / ответственный за выпуск Д.М. Серкин. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2019. – С. 385-386. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.

105. Abnormal circulating levels of metalloprotease 9 and its tissue inhibitor 1 in angiographically proven peripheral arterial disease: relationship to disease severity / М.Н. Tayebjee, К.Т. Tan, R.J. MacFadyen, G.Y. Lip. – DOI 10.1111/j.1365-2796.2004.01431.x // J Intern Med. – 2005. – Vol. 257. – P. 110-116.

106. Accidental Hypothermia: 2021 Update / P. Paal, M. Pasquier, T. Darocha [et al.]. – DOI 10.3390/ijerph19010501 // Int J Environ Res Public Health. – 2022 – Vol. 19 (1) – P.501.

107. Allen A.M. Tropical immersion foot / A.M. Allen, D. Taplin. – DOI 10.1016/s0140-6736(73)92949-8 // The Lancet. – 1973. – Vol. 302, № 7839. – P. 1185-1189.

108. Basit H. Frostbite / H. Basit, T.J. Wallen, C. Dudley // StatPearls. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30725599/> (date of the application: 12.09.2022).

109. Bassiouni W. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease / W. Bassiouni, M.A.M. Ali, R. Schulz. – DOI 10.1111/febs.15701 // FEBS J. – 2021. – Vol. 288 (24). – P. 7162-7182.
110. Bhardwaj N. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique / N. Bhardwaj, S.C. Kundu. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004 // Biotechnology Advances. – 2010. – Vol. 28, Issue 3. – P. 325-347.
111. Bonnans C. Remodelling the extracellular matrix in development and disease / C. Bonnans, J. Chou, Z. Werb. – DOI 10.1038/nrm3904 // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2014. – Vol. 15 (12). – P. 786-801.
112. Boulet L.P. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches / L.P. Boulet. – DOI 10.1097/mcp.0000000000000441 // Curr Opin Pulm Med. – 2018. – Vol. 24 (1). – P. 56-62.
113. Cao J. Biology and chemistry of matrix metalloproteinases (MMPs) / J. Cao, S. Zucker. – URL <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11034> (date of the application: 19.11.2021).
114. Cold injuries / R.F. Edlich, D.E. Chang, K.A. Birk [et al.] // Comprehensive therapy. – 1989. – Vol. 15, № 9. – P. 13-21.
115. Cooke J.P. Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair / J.P. Cooke. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.118.314669 // Circ Res. – 2019. – Vol. 124 (8). – P. 1166-1168.
116. D'Arcy C., Kiel C. Cell Adhesion Molecules in Normal Skin and Melanoma. *Biomolecules*. 2021 Aug 15;11(8):1213. doi: 10.3390/biom11081213.
117. Duong H., Patel G. Hypothermia. / H. Duong. – 2022 – In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing.
118. Efficacy of intravenous tissue plasminogen activator in frostbite patients and presentation of a treatment protocol for frostbite patients / A.R. Johnson, A.R. Johnson, H.L. Jensen [et al.]. – DOI 10.1177/1938640011422596 // Foot & ankle specialist. – 2011. – Vol. 4, № 6. – P. 344-348.

119. Egeblad M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression / M. Egeblad, Z. Werb. – DOI 10.1038/nrc745 // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 161-174.
120. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic Sclerosis / W.-U. Kim, S.Y. Min, M.L. Cho [et al.]. – DOI 10.1186/ar1454 // *Arthritis Res. Ther.* – 2005. – Vol. 7. – P. R71 – R79.
121. El-Sayed E.M. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review / E.M. El-Sayed, F.K. Asmaa, S.El-B. Samar. – DOI 10.1016/j.lfs.2019.116786 // *Life Sci.* – 2019. – Vol. 234. – P. 116786.
122. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances / D. Chouhan, N. Dey, N. Bhardwaj, B.B. Mandal. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2019.119267 // *Biomaterials.* – 2019. – Vol. 216. – P. 119267.
123. Expression and integrity of dermatopontin in chronic cutaneous wounds: a crucial factor in impaired wound healing / V.R. Krishnaswamy, M. Manikandan, A.K. Munirajan [et al.]. – DOI 10.1007/s00441-014-2000-z // *Cell Tissue Res.* – 2014. – Vol. 358. – P. 833-841.
124. Extracellular Matrix Markers and Methods for Their Study (Review) / E.V. Tush, T.I. Eliseeva, O.V. Khaletskaya [et al.]. – DOI 10.17691/stm2019.11.2.20 // *Modern Technologies in Medicine.* – 2019. – Vol. 11, № 2. – P. 133-149.
125. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot / V. Falanga. – DOI 10.1016/S0140-6736 (05)67700-8 // *The Lancet.* – 2005. – Vol. 366 (9498). – P.1736-1743.
126. Fan Z., Sun H. Editorial: Adhesion molecules and autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2022 Aug 18; 13: 1009708. doi: 10.3389/fimmu.2022.1009708.
127. Feng J., Wang J., Wang Y., Huang X., Shao T., Deng X., Cao Y., Zhou M., Zhao C. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation: Prospective Associations Between Ferroptosis and Delayed Wound Healing in Diabetic Ulcers. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jul 8; 10: 898657. doi: 10.3389/fcell.2022.898657.

128. Fingleton B. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes / B. Fingleton. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2017.05.010 // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2017. – Vol. 1864 (11 Pt A). – P. 2036-2042.

129. Frostbite: a practical approach to hospital management / C. Handford, P. Buxton, K. Russell [et al.] // *Extreme physiology & medicine.* – 2014. – Vol. 3, № 1. – P. 1-10.

130. Frostbite: Current status and advancements in therapeutics / K. Joshi, D. Goyary, B. Mazumder [et al.]. – DOI 10.1016/j.jtherbio.2020.102716 // *J Therm Biol.* – 2020. – Vol. 93. – P. 102716.

131. Frostbite: experimental assessment of tissue damage using Tc-99m pyrophosphate. Work in progress / Z. Salimi, M.K. Wolverson, D.R. Herbold, W. Vas. – DOI 10.1148/radiology.161.1.3020608 // *Radiology.* – 1986. – Vol. 161, № 1. – P. 227-231.

132. Frostbite injury: an unknown risk when using nitrous oxide as a party drug / M.L.J. Quax, T.J. Van Der Steenhoven, M.W.G. Antonius Bronkhorst, B.L. Emmink – DOI 10.1080/00015458.2020.1782160 // *Acta Chir Belg.* – 2022 – Vol. 122(2). – P.140-143.

133. Frostbite: pathogenesis and treatment / J.V. Murphy, P.E. Banwell, A.H. Roberts, D.A. McGrouther. – DOI 10.1097/00005373-200001000-00036 // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* – 2000. – Vol. 48, № 1. – P. 171.

134. Gianazza E., Brioschi M., Martinez Fernandez A., Casalnuovo F., Altomare A., Aldini G., Banfi C. Lipid Peroxidation in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2021 Jan 1; 34(1):49-98. doi: 10.1089/ars.2019.7955.

135. Golebiewska Ewelina M. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond / M. Golebiewska Ewelina, W.P. Alastair. – DOI 10.1016/j.blre.2014.10.003 // *Blood Reviews.* – 2015. – Vol. 29, Issue 3. – P. 153-162.

136. Granberg P.O. Freezing cold injury // *Arctic Med Res.* – 1991. – Vol. 50, suppl 6. – P. 76-79.

137. Gross E.A. Using thrombolytics in frostbite injury / E.A. Gross, J.C. Moore // *Journal of emergencies, trauma, and shock.* – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 267.

138. Hellmund K.S. Self-assembling peptides as extracellular matrix mimics to influence stem cell's fate / K.S. Hellmund, B. Kokschi. – DOI 10.3389/fchem.2019.00172 // *Front Chem.* – 2019. – Vol. 7. – P. 172.
139. Herschman Z. Hypothermia in the operating room and beyond / Z. Herschman // *Respir Care.* – 2004. – Vol. 49 (2). – P.158-159.
140. Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia // *Science.* – 1986. – Vol. 231, № 4735. – P. 234-241.
141. Hutchison R.L. Frostbite of the hand / R.L. Hutchison. – DOI 10.1016/j.jhsa.2014.01.035 // *J Hand Surg Am.* – 2014. – Vol. 39 (9). – P. 1863–1868.
142. Imray C. Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries / C. Imray, A. Grieve, S. Dhillon. – DOI 10.1136/pgmj.2008.068635 // *Postgraduate medical journal.* – 2009. – Vol. 85, № 1007. – P. 481-488.
143. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers / Y. Liu, D. Min, T. Bolton [et al.]. – DOI 10.2337/dc08-0763 // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32 (1). – P. 117-119.
144. Ingram B.J. Recognition and treatment of freezing and nonfreezing cold injuries / B.J. Ingram, T.J. Raymond. – DOI 10.1249/JSR.0b013e3182877454 // *Current sports medicine reports.* – 2013. – Vol. 12, № 2. – P. 125-130.
145. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements / P. Kolimi, S. Narala, D. Nyavanandi [et al.]. – DOI 10.3390/cells11152439 // *Cells.* – 2022. – Vol. 11 (15). – P. 2439.
146. Jaganjac M., Cindrić M., Jakovčević A., Žarković K., Žarković N. Lipid peroxidation in brain tumors. *Neurochem Int.* 2021 Oct; 149: 105118. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105118.
147. Krishnaswamy V.R. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds / V.R. Krishnaswamy, D. Mintz, I. Sagi. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2017.08.003 // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2017. – Vol. 1864 (11 Pt B). – P. 2220-2227.
148. Lang T. Fundamentals of the description of statistical analysis in articles published in medical journals. *Guide – Statistical Analysis and Methods in Published*

Literature (SAMPL) / T. Lang, D. Altman. – DOI 10.1016/j.ijnurstu.2014.09.006 // Medical technology. Rating and choice. – 2014. – Vol. 1, № 15. – P. 11-16.

149. Li J. Pathophysiology of acute wound healing / J. Li, J. Chen, R. Kirsner. – DOI 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007 // Clin Dermatol. – 2007. – Vol. 25 (1). – P. 9-18.

150. Lohana P. Therapeutic hypothermia and frostbite injury: a preventable source / P. Lohana, A. Hart. – DOI 10.1258/smj.2011.011101// Scottish Medical Journal. – 2011. – Vol. 56 (2). – P. 120.

151. Long-Term Sequelae of Frostbite-A Scoping Review / I.B. Regli, G. Strapazzon, M. Falla [et al.]. – DOI 10.3390/ijerph18189655 // Int J Environ Res Public Health. – 2021. – Vol. 18 (18). – P. 9655.

152. Managing frostbite / M.J. Hallam, T. Cubison, B. Dheansa, C. Imray. – DOI 10.1136/bmj.c5864 // Bmj. – 2010. – Vol. 341. – P. c5864.

153. Matrix metalloproteinases and risk stratification in patients undergoing surgical revascularisation for critical limb ischaemia / G. De Caridi, M. Massara, F. Spinelli [et al.]. – DOI 10.1111/iwj.12464 // Int Wound J. – 2016. – Vol. 13 (4). – P. 493-499.

154. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure / K.Y. DeLeon-Pennell, C.A. Meschiari, M. Jung, M.L. Lindsey. – DOI 10.1016/bs.pmbts.2017.02.001 // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2017. – Vol. 147. – P. 75-100.

155. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions / C. Amalinei, I.D. Căruntu, S.E. Giușcă, R.A. Bălan // Romanian J. Morphology Embriology. – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. 215-228.

156. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. / L.G.N. De Almeida, H. Thode, Y. Eslambolchi, S. Chopra, D. Young, S. Gill, L. Devel, A. Dufour. – DOI 10.1124/pharmrev.121.000349 // Pharmacol Rev. – 2022. – Vol. 74 (3). – P. 712-768.

157. McCawley L.J. Matrix metalloproteinases: they are not just for matrix anymore! / L.J. McCawley, L.M. Matrisian. – DOI 10.1016/s0955-0674(00)00248-9 // *Curr Opin Cell Biol.* – 2001. – Vol. 13 (5). – P. 534-540.

158. Metabolic Phenotyping in Venous Disease: The Need for Standardization / S. Onida, M.K.H. Tan, M. Kafeza [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jproteome.9b00460 // *J. Proteome Res.* – 2019. – Vol. 18. – P. 3809-3820.

159. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest / Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. – DOI 10.1056/NEJMoa012689 // *New England Journal of Medicine.* – 2002. – Vol. 346, № 8. – P. 549-556.

160. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin / J. Aziz, H. Shezali, Z. Radzi [et al.]. – DOI 10.1159/000447017 // *Skin Pharmacol Physiol.* – 2016. – Vol. 29. – P. 190-203.

161. Nagase H. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs / H. Nagase, R. Visse, G. Murphy. – DOI 10.1016/j.cardiores.2005.12.002 // *Cardiovasc Res.* – 2006. – Vol. 69 (3). – P. 562-573.

162. Nagase H. Zinc Metalloproteinases in health and disease / H. Nagase; ed. N.M. Hooper. – London: Taylor Francis Ltd, 1996. – 153 p.

163. National athletic trainers' association position statement: environmental cold injuries / T.A. Cappaert, J.A. Stone, J.W. Castellani [at al.] // *Journal of Athletic Training.* – 2008. – Vol. 43, № 6. – P. 640-658.

164. Next Generation Matrix Metalloproteinase Inhibitors – Novel Strategies Bring New Prospects / M. Levin, Y. Udi, I. Solomonov, I. Sagi. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2017.06.009 // *Biochim Biophys Acta.* – 2017. – Vol. 1864 (11 Pt A). – P. 1927-1939.

165. Niland S. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression / S. Niland, A.X. Riscanevo, J.A. Eble. – DOI 10.3390/ijms23010146 // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 23 (1). – P. 146.

166. Ning C. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases / N. Cui, M. Hu, R.A. Khalil. – DOI 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005 // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2017. – Vol. 147. – P. 1-73.

167. Oishi Y. Macrophages in inflammation, repair and regeneration / Y. Oishi, I. Manabe. – DOI 10.1093/intimm/dxy054 // Int Immunol. – 2018. – Vol. 30 (11). – P. 511-528.

168. Omics profiles in chronic venous ulcer wound fluid: Innovative applications for translational medicine / F. Mannello, D. Ligi, M. Canale, J.D. Raffetto // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2014. – Vol. 14. – P. 737-762.

169. Page-McCaw A. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling / A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb. – DOI 10.1038/nrm2125 // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2007. – Vol. 8 (3). – P. 221-233.

170. Powell T. Development of Second-degree Frostbite in Two Service Members Wearing Issued Cold Weather Footgear Traversing Sea Ice / T. Powell – DOI 10.1093 // Mil Med. – 2021 – Vol. 186 (11-12): e1250-e1253.

171. Proposed treatment protocol for frostbite: a retrospective analysis of 17 cases based on a 3-year single-institution experience / E.K. Woo, J.W. Lee, G.Y. Hur [et al.]. – DOI 10.5999/aps.2013.40.5.510 // Archives of plastic surgery. – 2013. – Vol. 40, № 5. – P. 510.

172. Prospective study on burns treated with Integra, a cellulose sponge and split thickness skin graft: Comparative clinical and histological study Randomized controlled trial / H. Lagus, M. Sarlomo-Rikala, T. Böhling, J. Vuola. – DOI 10.1016/j.burns.2013.04.023 // Burns. – 2013. – Vol. 39, issue 8. – P. 1577-1587.

173. Prospective study of a proactive palliative care rounding intervention in a medical ICU / N. Braus, T. C. Campbell, K. L. Kwekkeboom [et al.]. – DOI 10.1007/s00134-015-4098-1 // Intensive Care Medicine. – 2016. – Vol. 42, No. 1. – P. 54-62.

174. Protocatechuic acid inhibits TGF-beta1-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells / Y.D. Liu, X. Sun, Y. Zhang [et al.]. – DOI 10.1016/j.jphs.2018.10.011 // J Pharmacol Sci. – 2019. – Vol. 139 (1). – P. 9-14.

175. Raffetto J.D. Pathophysiology of chronic venous disease / J.D. Raffetto, F. Mannello // *Int. Angiol.* – 2014. – Vol. 33. – P. 212-221.

176. Raffetto J.D. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers / J.D. Raffetto. – DOI 10.1016/j.suc.2017.11.002 // *Surg. Clin. N. Am.* – 2018. – Vol. 98 (2). – P. 337-347.

177. Rayment E.A. Review: finding the culprit: a review of the influences of proteases on the chronic wound environment / E.A. Rayment, Z. Upton. – DOI 10.1177/1534734609331596 // *The International Journal of Lower Extremity Wounds.* – 2009. – Vol. 8 (1). – P. 19-27.

178. Reamy B.V. Frostbite: review and current concepts // *The Journal of the American Board of Family Practice.* – 1998. – Vol. 11, № 1. – P. 34-40.

179. Recent advances in hypertrophic scar / J. Zhang, Y. Li, X. Bai [et al.]. – DOI 10.14670/HH-11-908 // *Histol Histopathol.* – 2018. – Vol. 33 (1). – P. 27-39.

180. Recent Advances in Nano-Formulations for Skin Wound Repair Applications / Y. Lin, Z. Chen, Y. Liu [et al.]. – DOI 10.2147/DDDT.S375541 // *Drug Des Devel Ther.* – 2022. – Vol. 16. – P. 2707-2728.

181. Recent Advances in the Design of Three-Dimensional and Bioprinted Scaffolds for Full-Thickness Wound Healing / S.H. Tan, Z.H. Ngo, D.B. Sci [et al.]. – DOI 10.1089/ten.TEB.2020.0339 // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2022. – Vol. 28 (1). – P. 160-181.

182. Reduction of the incidence of amputation in frostbite injury with thrombolytic therapy / K.J. Bruen, J.R. Ballard, S.E. Morris [et al.]. – DOI 10.1001/archsurg.142.6.546 // *Archives of surgery.* – 2007. – Vol. 142, № 6. – P. 546-553.

183. Research progress in the pathogenic mechanisms and imaging of severe frostbite / Y. Gao, F. Wang, W. Zhou [et al.] // *European Journal of Radiology.* – 2021. – Vol. 137. – P. 109605.

184. Role and dynamics of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in burn patients / A.E. Stanciu, A. Zamfir-Chiru-Anton, M.M.

Stanciu [et al.]. – DOI 10.3892/etm.2021.10496 // *Exp Ther Med.* – 2021. – Vol. 22 (4). – P. 1062.

185. Role of matrix metalloproteinases in chronic wound healing: diagnostic and therapeutic implications / Y. Ren, G. Gu, M. Yao, V.R. Driver // *Chin. Med. J.* – 2014. – Vol. 127. – P. 1572-1581.

186. Serra R. Matrix Metalloproteinases in Health and Disease. / R. Serra – DOI 10.3390/biom10081138 // *Biomolecules.* – 2020 – Vol. 10 (8). – P. 1138.

187. Takeo M. Wound healing and skin regeneration / M. Takeo, W. Lee, M. Ito. – DOI 10.1101/cshperspect.a023267 // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2015. – Vol. 5. – P. a023267.

188. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation / N.T. Le, M. Xue, L.A. Castelnoble, C.J. Jackson. – DOI 10.2741/2161 // *Front Biosci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 1475-1487.

189. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases / G.A. Cabral-Pacheco, I. Garza-Veloz, C. Castruita-De la Rosa [et al.]. – DOI 10.3390/ijms21249739 // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 (24). – P. 9739.

190. Therapeutic strategies for skin regeneration based on biomedical substitutes / C. Chocarro-Wrona, E. López-Ruiz, M. Perán [et al.]. – DOI 10.1111/jdv.15391 // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2019. – Vol. 33 (3). – P. 484-496.

191. Valnicek S.M. Frostbite in the prairies: a 12-year review / S.M. Valnicek, L.R. Chasmar, J.B. Clapson // *Plastic and reconstructive surgery.* – 1993. – Vol. 92, № 4. – P. 633-641.

192. Vascular casts demonstrate microcirculatory insufficiency in acute frostbite / P.S. Daum, W.D. Jr. Bowers, J. Tejada, M.P. Hamlet // *Cryobiology.* – 1987. – Vol. 24, № 1. – P. 65-73.

193. Velnar T. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms / T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj. – DOI 10.1177/147323000903700531 // *Journal of International Medical Research.* – 2009. – Vol. 37 (5). – P. 1528-1542.

194. Visse R. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry / R. Visse, H. Nagase. – DOI 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D // *Circulation Research*. – 2003. – Vol. 92. – P. 827-839.

195. Wang X. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease / X. Wang, R.A. Khalil. – DOI 10.1016/bs.apha.2017.08.002 // *Adv Pharmacol*. – 2018. – Vol. 81. – P. 241-330.

196. Wei L., Xu Y., Zhang L., Yang L., Zhao R.C., Zhao D. Mesenchymal Stem Cells Promote Wound Healing and Effects on Expression of Matrix Metalloproteinases-8 and 9 in the Wound Tissue of Diabetic Rats. *Stem Cells Dev*. 2023 Jan; 32(1-2):25-31. doi: 10.1089/scd.2021.0218.

197. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: Overview on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment / J.D. Raffetto, D. Ligi, R. Maniscalco [et al.]. – DOI 10.3390/jcm10010029 // *J Clin Med*. – 2020. – Vol. 10 (1). – P. 29.

198. Wilderness Medical Society practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite: 2014 update / S.E. McIntosh, M. Opacic, L. Freer [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2014.09.001 // *Wilderness & environmental medicine*. – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 43-54.

199. Woessner F.J. Matrix metalloproteinases and TIMPs / F.J. Woessner, H. Nagase. – New York: Oxford Univ, 2001. – 223 p.

200. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis / H.E. Talbott, S. Mascharak, M. Griffin [et al.]. – DOI 10.1016/j.stem.2022.07.006 // *Cell Stem Cell*. – 2022. – Vol. 29 (8). – P. 1161-1180.

201. Xue M. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C Relevance to Inflammation in Rheumatoid Arthritis / M. Xue, J.W. Lee, G.Y. Hur [et al.] // *Arthritis Rheumatism*. – 2007. – Vol. 56, № 9. – P. 2864-2874.

202. Xue M. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring / M. Xue, C.J. Jackson. – DOI

10.1089/wound.2013.0485 // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2015. – Vol. 4 (3). – P. 119-136.

203. Yan C. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression / C. Yan, D.D. Boyd. – DOI 10.1002/jcp.20948 // *J Cell Physiol*. – 2007. – Vol. 211 (1). – P. 19-26.

204. Zafren K. Nonfreezing Cold Injury (Trench Foot) / K. Zafren. – DOI 10.3390/ijerph181910482 // *Int J Environ Res Public Health*. – 2021 – Vol. 18 (19) – P. 10482.