

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)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Шаповалов Константин Геннадьевич

Официальные оппоненты:

Шахматов Игорь Ильич – доктор медицинских наук, профессор. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии, г. Барнаул

Алексеев Рево Захарович – доктор медицинских наук, профессор. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, профессор кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф, г. Якутск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владивосток

Защита диссертации состоится «02» октября 2023 года в 09⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, <http://chitgma.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.077.01

д.м.н., доцент

Мироманова Наталья Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Холодовая травма является актуальной проблемой для большинства регионов России (Шуткин А.В., 2014; Чашин В.П. и соавт., 2017; Хапкина А.В. и соавт., 2017; Шаповалов К.Г., 2019). Лечение глубоких отморожений связано с частой инвалидностью и большими сроками репарации тканей (Кардовский А.Г., 2021).

Для раннего периода отморожений характерно повреждение и дисфункция эндотелия, нарушения иннервации, в результате происходит секреция биологически активных веществ, вызывающих воспаление и вторичную альтерацию тканей зоны криодеструкции, что способствует затяжному течению репаративных процессов (Михайличенко М.И., 2020). 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 (Сумин С.А., 2019).

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство внеклеточных протеиназ, занимающих центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах развития и ремоделирования клеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, неоангиогенезе, в процессах опухолевой трансформации и метастазирования. ММП активно изучаются в течении раневого процесса и ремоделировании тканей при ревматоидных артритах, остеоартритах, эндометриозе, аневризмах аорты, периодонтитах, аутоиммунных поражениях кожи, атероматозе, язвообразовании, сахарном диабете (Ярмолинская М.И., 2012; Ning C., 2017; El-Sayed E.M., 2019; de Almeida L.G.N., 2022).

Молекулы межклеточной адгезии представляют собой гетерогенную группу белков, связанных с плазматической мембраной, которые обеспечивают механическое взаимодействие клеток друг с другом или с компонентами внеклеточного матрикса, 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. При чрезмерной неконтролируемой активации эндотелия возникают микротромбы, развивается тканевая и клеточная гипоксия, отмечается избыточная сосудистая проницаемость и гиперпродукция свободных радикалов, что способствует прогрессированию воспаления, приводя к вторичному повреждению тканей (Москалец О.В., 2018; Москалец О.В., 2021).

Активацию ПОЛ у пациентов с местной холодовой травмой рассматривают как адаптивную реакцию организма на стресс и наличие продуктов тканевого распада. При этом в клетках возникает дефицит макроэргов, что ведет к «дыхательному взрыву» и избыточной генерации активных форм кислорода – инициаторов ПОЛ (Николаев В.М., 2018; Николаев В.М., 2020).

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 (Шаповалов К.Г., 2019; Сумин С.А., 2019; Regli I.V., 2021).

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время активно изучается роль матричных металлопротеиназ при заживлении диабетических ран, при ожогах, хронических венозных язвах нижних конечностей (Raffetto J.D., 2020; Stanciu A.E., 2021; Wei L., 2023). Рассматривается роль процессов перекисного окисления липидов при заживлении диабетических язв, злокачественных новообразованиях, атеросклерозе (Gianazza E., 2021; Jaganjac M., 2021; Feng J., 2022). Изучается роль молекул межклеточной адгезии в патогенезе меланомы, аутоиммунной патологии, инфекционных заболеваний (Москалец О.В., 2018; D'Arcy C., 2021; Fan Z., 2022). Однако, отсутствуют комплексные работы по оценке MMP, молекул межклеточной адгезии и процессов ПОЛ в динамике течения раневого процесса при отморожениях.

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

Цель работы: установить патогенетическое значение матричных 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 матричных 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 матричных

металлопротеиназ (ММР-2, ММР-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 на течение раневого процесса 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, позволяющий дифференцировать изменения коллагеновых волокон при холодовой альтерации.

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

Методология и методы исследования. Проведено одноцентровое проспективное открытое нерандомизированное контролируемое клиническое исследование 185 пациентов с местной холодовой травмой. В работе использовались клиничко-лабораторные, статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При местной холодовой травме у пациентов развивается альтеративное воспаление, при котором происходит ремоделирование тканей зоны криоповреждения 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 криоповреждения наблюдается дезорганизация экстрацеллюлярного матрикса с качественными изменениями ширины и ориентации коллагеновых волокон.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты 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» Минздрава России, 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 28.08.2019 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, в том числе 6 статей в ведущих научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 из которых находятся в единой международной научной базе цитирования Scopus, 1 – Web of Science.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 204 источника. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц и 26 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведено одноцентровое проспективное открытое нерандомизированное контролируемое клиническое исследование. Учитывая нестандартную процедуру обследования пациентов, исследование относится к интервенционному, по длительности – к продолжительному.

В исследование включены 185 больных с отморожениями нижних конечностей III и IV степени тяжести в разные периоды местной холодовой травмы (МХТ), находившихся на стационарном лечении в Краевом ожоговом центре ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Читы с 2016 по 2020 гг. Из числа включенных в исследование сформировано три группы пациентов в зависимости от массива пораженных холодом тканей (рис. 1).

Исследование одобрено решением локального этического комитета ФГБОУ ВО ЧГМА № 93 от 09.04.2019 г. В работе с людьми соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Объектом исследования являлись здоровые люди и пострадавшие с местной холодовой травмой, а также их центрифугированная кровь, ткани зоны криповреждения в зоне демаркации и ткани умерших людей от острой травмы без тяжелой сопутствующей патологии (служили группой контроля при морфологическом исследовании тканей для группы пациентов с криотравмой).

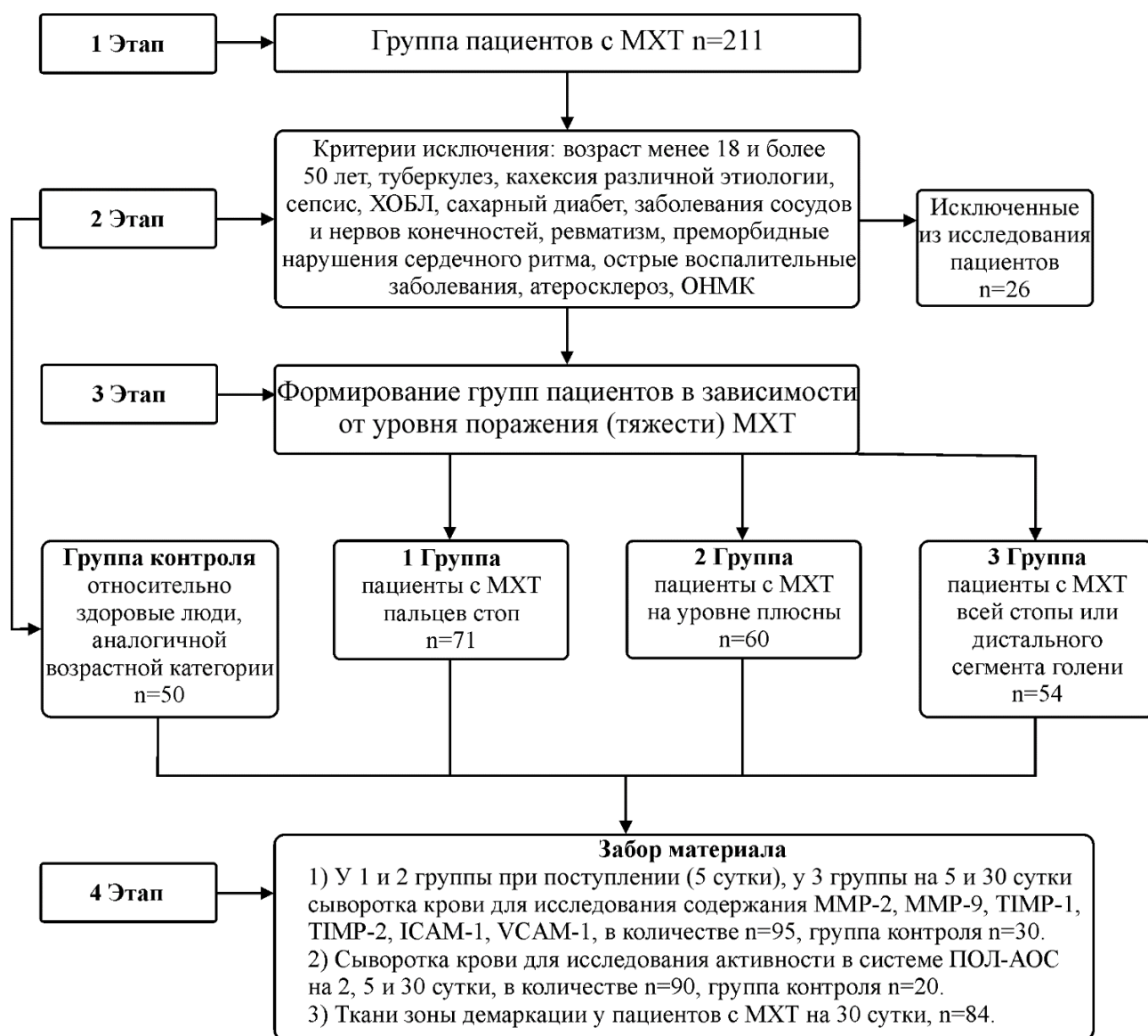


Рисунок 1. Схема дизайна исследования

Содержание матричных металлопротеиназ и их ингибиторов (ММР-2, ММР-9, TIMP-1, TIMP-2), молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) осуществляли методом мультиплексного анализа с помощью диагностического планшета LEGENDplex™ фирмы BioLegend.

Изучение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы. В основу определения диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, а также веществ с изолированными двойными связями взят метод И.А. Волчегорского (1989).

Для изучения уровня промежуточных интермедиатов свободнорадикального окисления липидов использовали тест Л.И. Андреевой с тиобарбитуровой кислотой (1988). Определение суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови выполнено по методу Промыслова М.Ш. (1990). Перекисную резистентность эритроцитов определяли согласно описанию Г.А. Яровой (1987). Определение активности каталазы осуществляли по методу М.А. Корлюк (1988).

Морфологическое изучение тканей. Гистологическое изучение тканей включало стандартные способы фиксации (10% раствор нейтрального формалина), парафиновую заливку и приготовление срезов толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Морфометрические исследования по измерению толщины коллагеновых волокон выполнены на основе визуальных измерений характерных участков микрофотографии.

Компьютерный анализ микрофотографий. Изображения микрофотографий подвергались преобразованию в градации серого. Полученное серое изображение преобразовывалось в поверхность типа ArcINFO GRID. По модели GRID рассчитывалась поверхность значений коэффициентов кривизны. Для каждого изображения в блоках размером 100x100 пикселей была рассчитана статистика значений коэффициента кривизны (КК). На основе стандартного отклонения значений КК выполнена классификация микрофотографий по классам: Контроль → Переходный класс → Больные.

Статистическая обработка материала. Результаты исследования представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3). Сравнение номинальных данных исследования проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона. Для оценки связи между двумя количественными показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (rS). Для изучения связей и важности независимых переменных в исследуемых группах и периодах использовался многослойный перцептрон. Для определения порога обнаружения тяжелой степени отмирания применялся ROC-анализ. Для построения моделей прогнозирования использовался регрессионный анализ. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование уровня матричных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-9) и их ингибиторов (ТИМР-1, ТИМР-2) при отморожениях нижних конечностей

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.

В позднем реактивном периоде (ПРП) у пациентов с криоповреждением уровень ММР-2 в 3,4 раза выше относительно контроля, в периоде гранулирования и эпителизации (ПГЭ) – значения ММР-2 не отличались от контрольных показателей. Уровень желатиназы В (ММР-9) у пострадавших с местной холодовой травмой в ПРП в 14,5 раз выше показателей контроля, в ПГЭ – в 12,5 раз выше относительно группы контроля. У пациентов с криоповреждением уровень ТИМР-1 в 1,7 раза выше относительно контроля, в ПГЭ – значения ТИМР-1 больше в 2 раза относительно контроля. Уровень ТИМР-2 у пациентов в ранние сроки с момента криоповреждения в 2,3 раза больше показателей контроля, в поздние сроки – в 2,2 раза больше относительно группы контроля (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание ММР-2, ММР-9, ТИМР-1, ТИМР-2 в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в разные периоды криоповреждения (Ме [Q1; Q3])

	ММР-2 (нг/мл)	ММР-9 (нг/мл)	ТИМР-1 (нг/мл)	ТИМР-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

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p₁ – достоверность разницы показателей у больных с отморожениями в динамике.

Этот факт патогенетически обосновывает большое количество поздних осложнений у пациентов с МХТ и объясняет затяжное течение раневого процесса.

При исследовании изучаемых показателей у пострадавших в зависимости от массива криоповреждения тканей дистальных отделов стоп выявлено, что уровень ММР-2 в кровотоке в 2,1 раза выше относительно контроля, у пациентов с отморожениями более проксимальных сегментов стопы – значение ММР-2 в 2,6 раза выше контрольных показателей. Уровень ММР-2 у пострадавших с самыми тяжелыми отморожениями в 3,5 раза выше контрольных значений. Уровень ММР-9 у пострадавших с отморожением пальцев стоп в 4,9 раза выше показателей контроля, а у пациентов с более тяжелыми отморожениями – в 10 раз выше относительно группы контроля. У больных с отморожениями 3-й

группы уровень ММР-9 увеличивался в 14,5 раз относительно значений контроля (табл. 2).

У пациентов с криповреждением дистальных отделов стоп уровень TIMP-1 в крови в 2 раза выше относительно контроля, у пациентов с отморожениями более проксимальных сегментов стопы – значение TIMP-1 в 1,8 раза выше контрольных показателей. Уровень TIMP-1 у пострадавших с самыми тяжелыми отморожениями в 1,6 раза выше контрольных значений. Уровень TIMP-2 в крови пострадавших с местной холодовой травмой пальцев стоп в 2,1 раза выше показателей контроля, у пациентов с более тяжелыми отморожениями – в 2,2 раз выше относительно группы контроля. У больных с отморожениями 3-й группы уровень TIMP-2 в 2,3 раза превышает значения контроля (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание ММР-2, ММР-9, TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в зависимости от объема пораженных тканей (Me [Q1; Q3])

	ММР-2 (нг/мл)	ММР-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
p – достоверность разницы показателей относительно контроля; p ₁ – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных; p ₂ – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных.				

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

Исследование активности молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) в системном кровотоке при отморожениях нижних конечностей

У пациентов с местной холодовой травмой в ранние сроки в сыворотке крови по сравнению с группой контроля повышалась концентрации ICAM-1 в 22,6 раза, VCAM-1 в 1,9 раза (табл. 3).

В поздние сроки с момента отморожения величины концентрации в кровотоке адгезивных молекул оставались значительно выше контрольных значений: содержание ICAM-1 – в 6,3 раза. Однако, уровень VCAM-1 не отличался от контроля. Максимальное содержание адгезивных молекул у пострадавших наблюдалось в ранние сроки у пациентов с самыми тяжелыми

формами отморожения. Не исключено, что молекулы адгезии у пострадавших реализуют своего рода компенсаторный механизм, который способствует обеспечению точной настройки миграции лейкоцитов сквозь эндотелий при воспалении и последовательное прибытие в очаг различных клеточных популяций (Шаповалов К.Г., 2008; Кузник Б.И., 2014; Läubli H., 2019).

Таблица 3 – Содержание VCAM-1, ICAM-1 в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в разные периоды криповреждения 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

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;
p₁ – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных;
p₂ – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных.

Данный феномен свидетельствует о длительно текущем воспалении с процессами эндотелиальной дисфункции и затяжном течении раневого процесса.

При исследовании изучаемых показателей у пострадавших в зависимости от массива криповреждения с отморожением дистальных сегментов стоп было выявлено, что уровень ICAM-1 и значение VCAM-1 не изменялось относительно контроля. У больных с поражением всей стопы уровень ICAM-1 увеличивался в 2,9 раза, значение VCAM-1 не изменилось относительно контроля. У пациентов с криповреждением до уровня нижней трети голени уровень ICAM-1 повышался в 7,5 раз, значение VCAM-1 – в 2,4 раза (табл. 4).

Таблица 4 – Содержание VCAM-1, ICAM-1 в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в зависимости от объема 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

p₁ – достоверность разницы показателей относительно контроля;
p₂ – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных;
p₃ – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных.

Исследование активности в системе ПОЛ-АОС в системном кровотоке при местной холодовой травме нижних конечностей

У пациентов в раннем реактивном периоде (РРП) отморожений относительно контроля уровень диеновых конъюгат в изопропанольной фазе, кетодиенов и сопряженных триенов повышался, значение коэффициента E232/E220 и E278/E220 уменьшалось. В последующих периодах их значения существенно отличались от группы контроля, относительно предыдущего периода не изменились.

В РРП отморожений регистрировалось увеличение содержания первичных продуктов ПОЛ гептановой фазы. Уровень диеновых конъюгат, кетодиенов и сопряженных триенов возрастал, а E278/E220 – уменьшалось. Коэффициент E232/E220 оставался на уровне контроля.

В РРП в эритроцитах уровень ТБК-активных продуктов возрастал относительно контроля, в ПРП достигал максимума, а в последующем был выше показателей контрольной группы.

В РРП холодовой травмы падение каталазной активности в эритроцитах проявлялось в наибольшей степени, в ПРП и ПГЭ снижалась относительно группы контроля. Динамики общей антиоксидантной активности сыворотки крови у больных с местной холодовой травмой относительно здоровых людей не отмечалось.

Таким образом, несмотря на повышение содержания вторичных продуктов ПОЛ и возрастание каталазной активности в эритроцитах, в сыворотке пациентов не регистрировалось значимых отклонений исследуемых параметров. Следовательно, «окислительный стресс» у больных с местной холодовой травмой проявлялся менее значимо относительно пациентов с тяжелыми термомеханическими повреждениями или критическими изменениями жизненно важных органов (Капитонов В.М., 2010).

При исследовании изучаемых показателей у пострадавших в зависимости от массива криоповреждения (1 группа), выявлено, что в сыворотке крови больных изопропанольной фазы уровень диеновых конъюгат, кетодиенов и сопряженных триенов повышался, значение коэффициентов E232/E220 и E278/E220 уменьшалось. В 2-й и 3-й группах показатели значительно отличались от здоровых людей, не меняясь существенно относительно больных 1 группы.

У больных 1-й группы в сыворотке крови регистрировалось повышение диеновых конъюгат гептановой фазы, а также кетодиенов и сопряженных триенов, значение коэффициента E278/E220 уменьшалось, E232/E220 не менялось. В последующих группах показатели значительно отличались от здоровых людей, относительно больных 1 группы не изменялись. Показатели E232/E220 и E278/E220 оставались на уровне контроля.

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.

Указанные изменения отражали степень постгипоксических изменений в результате действия холода, а также нарушений кровообращения и тканевого обмена на фоне развития воспалительной реакции.

Исследование морфологических особенностей изменения тканей при отморожениях нижних конечностей

При холодом воздействии в тканях развиваются тяжелые воспалительные, дистрофические и некротические изменения.

При патоморфологическом изучении кожи в поздние сроки отмечались выраженные дистрофические изменения, которые обусловлены длительным воспалением в зоне холодовой альтерации. Дерма с тяжелыми циркуляторными нарушениями, но с сохраненным строением или умеренными дистрофическими изменениями кожных дериватов. Волокна поперечнополосатой и гладкой мышечной ткани с отсутствием в части из них ядер, исчезновением поперечной исчерченности. В некоторых клетках имелось несколько ядер, что говорит о регенерации мышечной ткани. На отдельных участках густая, диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация. Наблюдалась явления замещения мышечной ткани соединительной, с очагами дистрофического обызвествления.

Выраженным изменениям при холодовой травме были подвержены кровеносные сосуды, что доказывает их высокую чувствительность к низким температурам. При изучении гистологических препаратов отмечалось утолщение стенок артерий, разрастание соединительной ткани, сужение просвета. Наряду с этим, наблюдалось резкое расширение сосудов, очаговая воспалительная периваскулярная инфильтрация. В просвете сосудов распространенные тромбозы с явлениями организации, реканализации. Стенки вен так же утолщены, просвет выполнен красными тромбами.

При изучении периферических нервов кожи и мягких тканей отмечались минимальные дистрофические изменения.

Морфометрические исследования толщины коллагеновых волокон при отморожениях

Выявлено значительное увеличение толщины коллагеновых волокон у группы больных относительно группы контроля в поздние сроки криоповреждения. Этот факт подтверждает активность деструктивных процессов в коллагеновых волокнах в поздние сроки с момента травмы, что проявляется в виде изменения их толщины и ориентации. Происходит так называемая дезорганизация экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), компонентами которого являются коллагеновые волокна.

Повышенный уровень матриксных 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 2 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 длины, толщины и ориентации коллагеновых волокон зоны криповреждения.

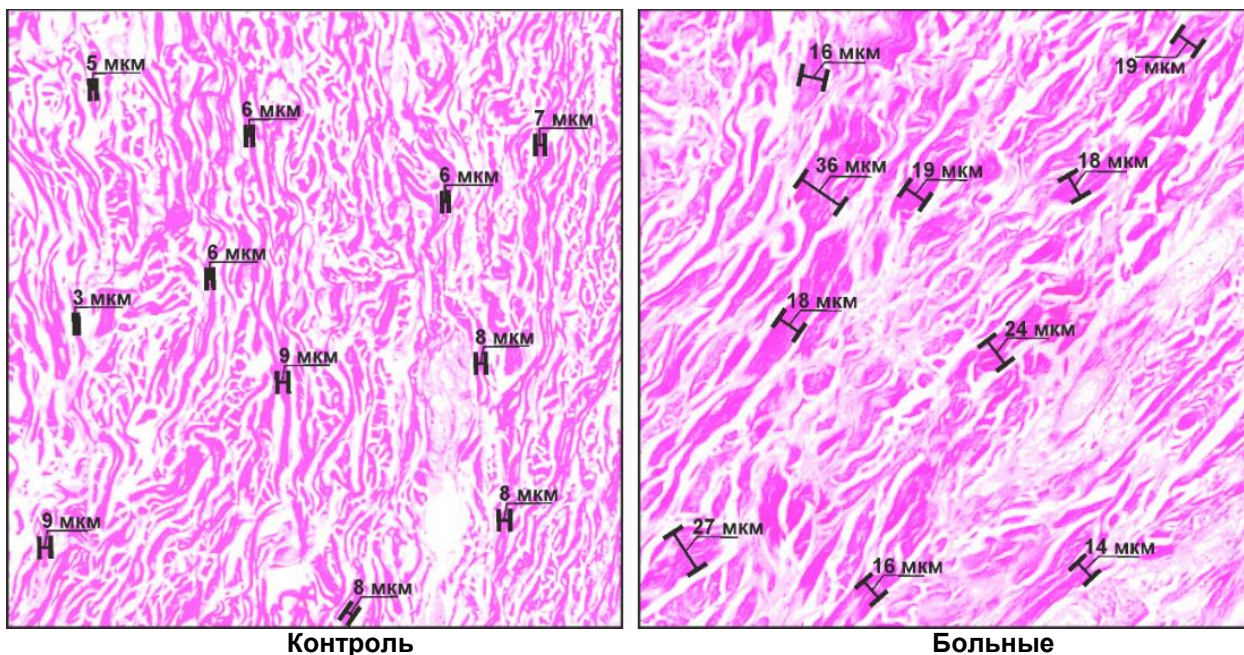


Рисунок 2. Толщина коллагеновых волокон у группы контроля и больных при отморожениях. Увеличение окуляра 5X. Фото автора

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

В ПРП у пациентов с криповреждением толщина волокон в 2,8 раза выше относительно контроля ($p < 0,001$), а стандартное отклонение КК в исследуемой области микрофотографии в 1,8 раза ниже относительно группы контроля ($p < 0,001$) (рис.3).

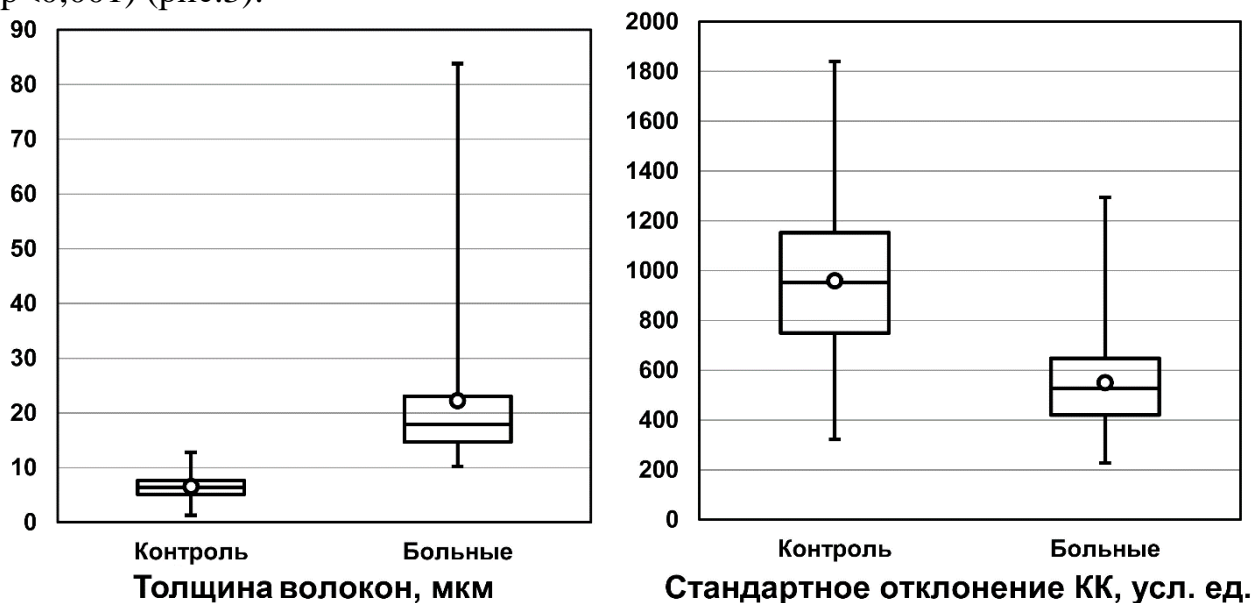
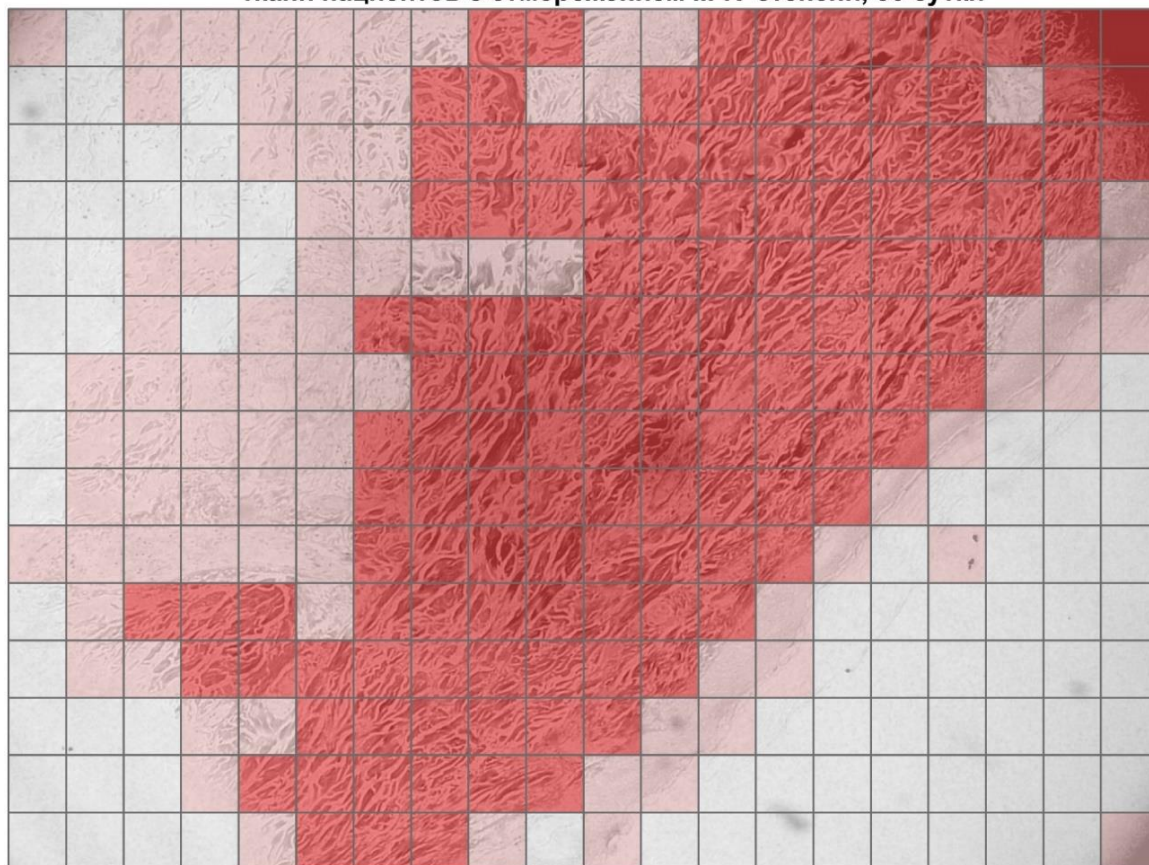


Рисунок 3. Толщина волокон и стандартное отклонение КК в исследуемой области микрофотографии

Ткани пациентов с отморожением III-IV степени, 30 суток



Ткани пациента из контрольной группы

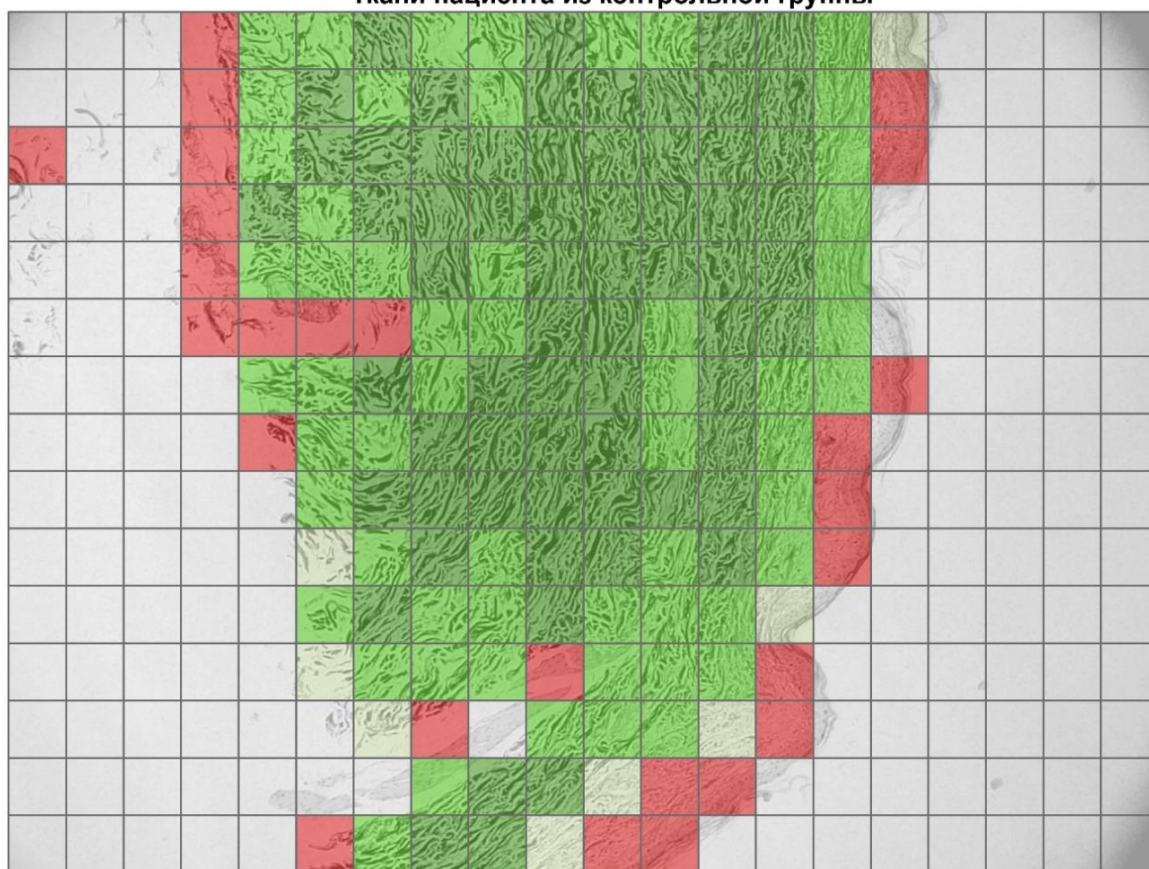


Рисунок 4. Классификация микрофотографии по значениям стандартного отклонения КК. Фото автора.

При значительном криповреждении тканей происходит изменение толщины и ориентации коллагеновых волокон, что хорошо сопоставляется в поле зрения микрофотографии. В этой связи, изменение текстуры микрофотографии, приводит к изменению численных характеристик стандартного отклонения КК в исследуемой области. Это подтверждается сильной обратной корреляционной связью между измеренной толщиной коллагеновых волокон и показателем стандартного отклонения КК в исследуемой области микрофотографии (-0,75; $p < 0,001$).

Таким образом, показатель КК позволяет отнести ту или иную микрофотографию к числу имеющих патологические признаки, либо к образцу здоровых тканей. Этот факт позволяет на основе статистических показателей стандартного отклонения КК классифицировать область исследования микрофотографии: Контроль → Переходный класс → Больные (рис. 4).

На основе полученной классификации наглядно продемонстрировано отличие микрофотографии тканей пациентов с отморожением III-IV степени на 30 сутки от контрольной группы (рис. 4).

При отморожениях происходит выраженное повреждение тканей, сопровождающееся деструктивными процессами компонентов внеклеточного матрикса. Низкие температуры способствуют изменению ширины и ориентации коллагеновых волокон в зоне повреждения.

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

Корреляционные связи между содержанием матриксных металлопротеиназ, их ингибиторами и активностью молекул межклеточной адгезии при отморожениях

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 (рис. 5). Эти параметры значительно повышаются в ПРП относительно контроля. Секреция молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 и матриксной металлопротеиназы MMP-2 ввиду резкого повышения их уровня при криповреждении и общих механизмах, способствующих их продукции, доказывает очень сильную корреляционную зависимость. Таким образом, повреждение эндотелия при холодовой травме являлось пусковым фактором развития воспалительной реакции и продукции желатиназ и молекул межклеточной адгезии.

В исследуемых группах по уровню поражения при отморожении 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; $p < 0,001$). Высокий коэффициент корреляции объясняется тем, что MMP-9 обладает стимулирующим эффектом, а MMP-2 ингибиторным эффектом в отношении воспаления. При холодовой альтерации ярко выражена картина воспаления, поэтому уровень MMP-2 и MMP-9 повышается и остается на высоких цифрах по мере увеличения объема поврежденных холодом тканей и в течение длительного времени (рис. 5).

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	ICAM-1	VCAM-1	Условные обозначения		
MMP-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	В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ	Очень сильная	0,81-1,00
MMP-9	0,75 p<0,001		0,05 p=0,589	0,45 p<0,001	0,84 p<0,001	0,75 p<0,001		Сильная	0,61-0,80
TIMP-1	0,28 p=0,004	0,33 p=0,001		0,36 p=0,001	0,08 p=0,339	-0,14 p=0,096		Относительно сильная	0,41-0,60
TIMP-2	0,65 p<0,001	0,60 p<0,001	0,35 p<0,001		0,48 p<0,001	0,29 p<0,001		Средняя	0,21-0,40
ICAM-1	0,85 p<0,001	0,72 p<0,001	0,32 p=0,001	0,66 p<0,001		0,67 p<0,001		Слабая	0,11-0,20
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	менее 0,10
В ИССЛЕДУЕМЫХ ПЕРИОДАХ									

Рисунок 5. Корреляционные связи MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, VCAM-1, ICAM-1 при отморожениях в исследуемых группах и периодах

Процессы воспаления, ремоделирования тканей и репарации после криоповреждения имеют значительную изменчивость. Выявлено, что активность воспаления, процессов эндотелиальной дисфункции повышается в зависимости от периода травмы и массива пораженных холодом тканей.

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

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) (рис.6).

	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
	0,81-1,00	0,61-0,80	0,41-0,60	0,21-0,40	0,11-0,20	менее 0,10

Рисунок 6. Корреляционные связи морфометрических изменений коллагеновых волокон с уровнем MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, VCAM-1, ICAM-1 при отморожениях

С перечисленными параметрами отмечена сильная и относительно сильная связь стандартного отклонения КК. Эти параметры значительно повышаются в ПРП 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.

Модель прогнозирования уровня повреждения тканей на основе активности матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов и активности молекул межклеточной адгезии при отморожениях

На основании анализа уравнения линейной регрессии, в которое были включены исходные показатели (матриксные металлопротеиназы, их ингибиторы и активность молекул межклеточной адгезии), разработана модель прогнозирования уровня повреждения тканей при отморожении (табл. 5). Показатели с недостаточной значимостью удалены из структуры исходной модели.

В результате вычислений модель прогнозирует уровень поражения тканей, при этом характеризуя принадлежность пациента к определенной группе. При значениях модели ($ПМ_1$) от 0,68 до 1,41 прогнозируют зону деструкции на уровне пальцев стоп, при значениях от 1,42 до 2,38 граница предполагаемого поражения достигает предплюсно-плюсневого сочленения, более 2,38 – до уровня нижней трети голени.

Таблица 5 – Определение множественного коэффициента детерминации полученной модели ($ПМ_1$)

Модель	R	R ²	Скорректированный R ²	Стандартная ошибка оценки
$ПМ_1=0,15752 \times (MMP-2) + 0,00231 \times (MMP-9) + 0,00065 \times (TIMP-2) + 0,04399 \times (ICAM-1) + 0,00317 \times (VCAM-1) - 0,71615$	0,979	0,959	0,957	0,214

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

На основании анализа уравнения линейной регрессии, в которое были включены исходные показатели системы ПОЛ-АОС, разработана модель прогнозирования уровня повреждения тканей при отморожении (табл. 6). Показатели с недостаточной значимостью удалены из структуры исходной модели.

В результате вычислений модель прогнозирует уровень поражения тканей, при этом характеризуя принадлежность пациента к определенной группе. При значениях модели ($ПМ_2$) от 0,72 до 1,46 прогнозируют зону деструкции на

уровне пальцев стоп, при значениях от 1,47 до 2,50 граница предполагаемого поражения распространялась до предплюсно-плюсневого сочленения, более 2,50 – до уровня нижней трети голени.

Таблица 6 – Определение множественного коэффициента детерминации полученной модели (ПМ₂)

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

Резюмируя изложенное, ниже представлена схема патогенеза течения раневого процесса при МХТ (рис. 7).

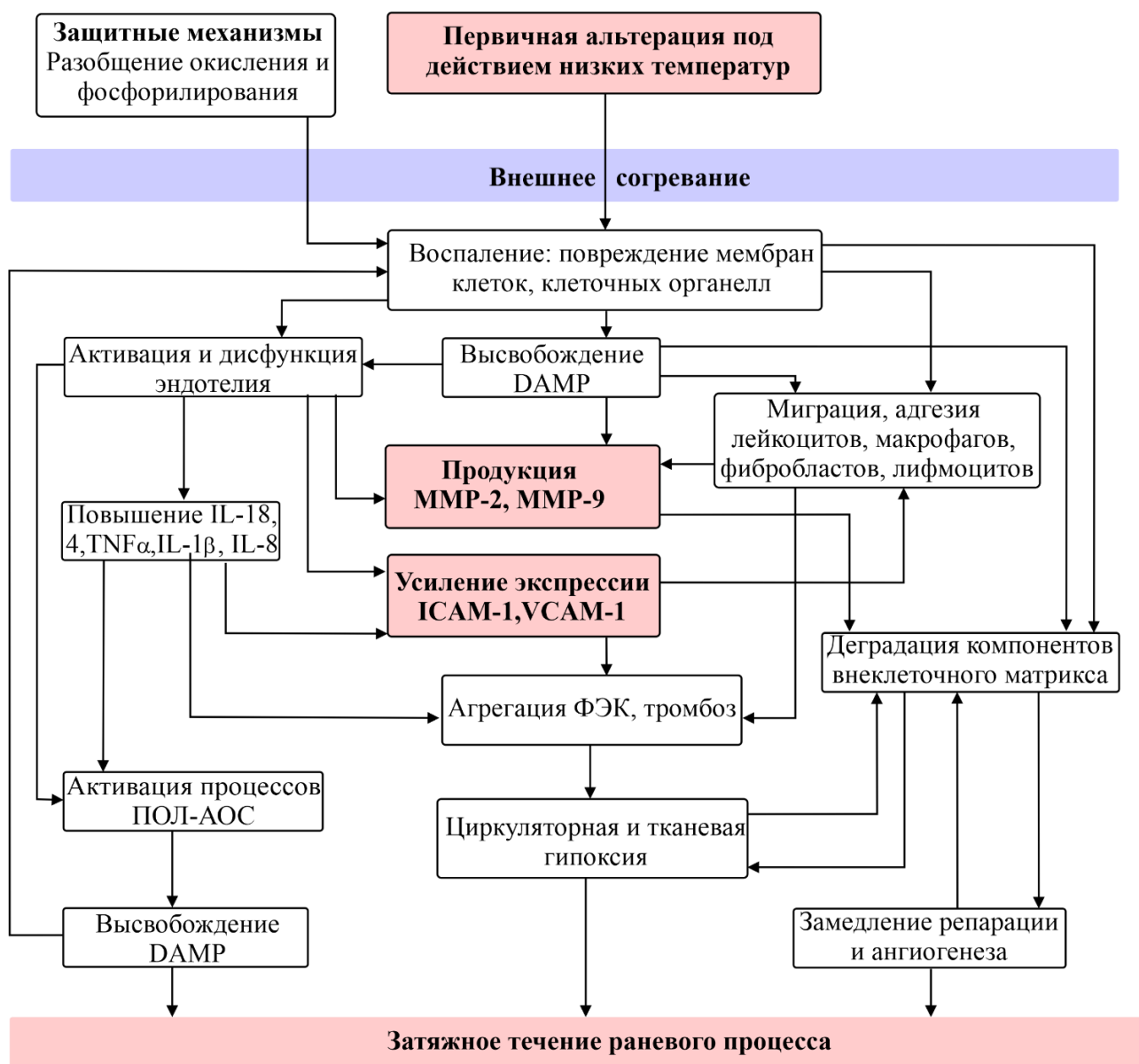


Рисунок 7. Схема патогенетических механизмов при криотравме

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.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ **Публикации в научных рецензируемых журналах, определенных ВАК** **Минобрнауки России:**

1. Динамика матриксных металлопротеиназ при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, О.С. Груздева. – DOI 10.29413/ABS.2019-4.5.13 // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2019. – Т. 4, № 5. – С. 79–83.
2. 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>.
3. 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. – DOI 10.25789/YMJ.2020.70.22 // Якутский медицинский журнал. – 2020. – № 2 (70). – С. 72–76.

4. Динамика молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, О.С. Груздева [и др.]. – DOI 10.25555/THR.2021.2.0976 // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2021. – № 2. – С. 70–79.
5. 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.
6. 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>.

Публикации в прочих изданиях:

7. 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.
8. Груздева О.С. Особенности течения и исходы при местной холодовой травме конечностей / О.С. Груздева, М.И. Михайличенко // Современные проблемы анестезиологии и реаниматологии. Всероссийская конференция : материалы V съезда анестезиологов-реаниматологов Забайкалья, г. Чита, 17-18 апреля 2019 г. / под общей редакцией К.Г. Шаповалова. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2019. – С. 23–25. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-33-0.
9. 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. Всероссийская конференция с международным участием : сборник научных трудов, г. Чита, 29-30 апреля 2020 г. / под общей редакцией К.Г. Шаповалова. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2020. – С. 32–38. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-33-0.

Список сокращений

GRID	Матрица со значениями исследуемого параметра
ICAM-1	Молекула межклеточной адгезии 1
IL	Interleukin (интерлейкин)
TNF α	Фактор некроза опухоли α
VCAM-1	Молекула адгезии сосудистых клеток 1
АОС	Антиоксидантная система
ВКМ	Внутриклеточный матрикс
ГИС	Геоинформационные системы
ДК	Диеновые конъюгаты
КК	Коэффициент кривизны
ММП	Матриксные металлопротеиназы
МХТ	Местная холодовая травма
ОАА	Общая антиоксидантная активность
ПГЭ	Период гранулирования и эпителизации
ПОЛ	Перекисное окисление липидов
ПП	Поздний реактивный период
ПМ	Прогностическая модель
РРП	Ранний реактивный период
ТИМР/ ТИМП	Тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ
ХОБЛ	Хроническая обструктивная болезнь легких
ЭЦМ	Экстрацеллюлярный матрикс