

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

*На правах рукописи*



Михайличенко Максим Игоревич

**Местная холодовая травма:  
клинико-патогенетические механизмы и прогнозирование исходов**

14.03.03 - Патологическая физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук, профессор  
Шаповалов Константин Геннадьевич

Чита – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. Обзор литературы. Патогенез и лечение местной холодовой травмы</b> ..	18
1.1. Историческая справка.....	18
1.2. Эпидемиология местной холодовой травмы.....	19
1.3. Теории прямого повреждения клеток и последующей «кожной» ишемии.....	21
1.4. Экспериментальные исследования по проблеме местных поражений холодом.....	22
1.5. Повреждение и дисфункция эндотелия при отморожениях .....	26
1.6. Изменение уровня цитокинов при отморожениях.....	31
1.7. Изменения системы гемостаза при отморожениях.....	36
1.8. Влияние нарушений микрокровотока на течение и исходы комплексного лечения отморожений.....	39
1.9. Раннее прогнозирование осложнений криоповреждения... ..	41
1.10. Комплексное лечение отморожений.....	44
<b>ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования</b> .....	50
2.1. Характеристика клинической группы.....	50
2.2. Методики исследования.....	54
2.3. Статистическая обработка полученных результатов.....	63
<b>ГЛАВА 3. Исследование состояния микроциркуляторного русла и биоэлектрической активности мышц у больных с местной холодовой травмой</b> .....	65
3.1. Исследование состояния микроциркуляции, сосудистого тонуса и электронейромиографических потенциалов в разные периоды местной холодовой травмы .....	66
3.2. Исследование состояния микроциркуляции, сосудистого тонуса и биоэлектрической активности мышц при различной тяжести местной холодовой травмы .....	69

3.3. Использование метода ЛДФ для получения критериев раннего прогнозирования течения раневого процесса при местной холодовой травме.....	71
3.4. Использование ЭНМГ для прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей.....	75
3.5. Использование ЭНМГ для прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме нижних конечностей.....	77
3.6. Программа ЭВМ для ранней диагностики уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени.....	80
<b>ГЛАВА 4. Исследование уровня содержания матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов у пациентов с местной холодовой травмой.....</b>	<b>81</b>
4.1. Содержание матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в разные периоды криоповреждения.....	81
4.2. Содержанием матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов при различной тяжести отморожений.....	83
4.3. Значимость показателей динамики уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отморожении .....	85
<b>ГЛАВА 5. Сывороточный кальпротектин и активность межклеточных взаимодействий при местной холодовой травме.....</b>	<b>87</b>
5.1. Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК у пострадавших в разные периоды криотравмы.....	88
5.2. Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК у пострадавших в зависимости от уровня повреждения тканей.....	89
5.3. Значимость показателей асимметричного диметиларгинина, оксида азота и циркулирующих эндотелиальных клеток в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отморожении.....	91

5.4. Сывороточный кальпротектин и феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при криоповреждении.....	92
<b>ГЛАВА 6. Молекулы межклеточной адгезии и асимметричный диметиларгинин у пациентов с отморожениями.....</b>	<b>96</b>
6.1. Динамика концентрации молекул межклеточной адгезии и уровня асимметричного диметиларгинина у пострадавших в разные периоды криотравмы.....	96
6.2. Динамика концентрации молекул межклеточной адгезии и уровня ассметричного диметиларгинина при различной тяжести местной холодовой травмы.....	98
<b>ГЛАВА 7. Биомаркеры клеточных повреждений и цитодегенеративные процессы при криотравме.....</b>	<b>102</b>
7.1. Содержание миелопероксидазы у пациентов с местной холодовой травмой.....	102
7.2. Уровень периферического нейрофиламента у больных с криоповреждением.....	104
<b>ГЛАВА 8. Корреляционные взаимосвязи уровня маркеров состояния эндотелия, периферической нервной системы и репарации при местной холодовой травме .....</b>	<b>107</b>
<b>ГЛАВА 9. Классификация осложнений местной холодовой травмы.....</b>	<b>111</b>
<b>ГЛАВА 10. Анализ комплексного лечения и прогнозирование уровня повреждения и осложнений при криотравме.....</b>	<b>119</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>132</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>167</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>169</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>170</b>
<b>ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ.....</b>	<b>171</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>178</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Местная криотравма в структуре травматических повреждений в зоне с умеренным климатом составляет примерно 1%; в Сибири, на Дальнем Востоке и в Северных регионах достигает 6-20% [В.А. Сизоненко, 2008; К.Г. Шаповалов и соавт. 2009; J. Gorjanc et al., 2019]. Значимость холодовых поражений обусловлена не столько относительно большим их числом, сколько сложностью лечения, длительностью утраты трудоспособности и высоким уровнем инвалидности исходов курации. Последние годы отмечены углублением исследований отечественных и зарубежных авторов по вопросам патогенеза холодовой травмы, ранней диагностики глубины поражений тканей, способов комплексного лечения глубоких отморожений конечностей и реабилитации [Ю.С. Винник и соавт. 2011; А.В. Хапкина и соавт. 2017; Е.А. Томина и соавт. 2008; В.Ф. Цхай и соавт 2013; К.Л. Bruen et al. 2007].

Патогенез отморожений достаточно сложен и многообразен. Вследствие холодового воздействия происходят нарушения гемореологии в пораженных сегментах, что приводит к тромбозам и некрозу пораженных тканей конечностей. Дальнейшее течение раневого процесса сопровождается развитием инфекционно-воспалительных осложнений, калечащих и травматичных операций и существенной утратой трудоспособности [Н.Н. Петрищев и соавт. 2003; М.Г. Карайланов и соавт. 2008; Ю.Г. Шапкин и соавт. 2014; С.А. Сумини соавт. 2019; R.L. Hutchison 2014].

Значительное количество пациентов с местной холодовой травмой имеют неблагоприятный преморбидный фон. Характерной особенностью эпидемиологии отморожений является то, что большинство пострадавших ведет асоциальный образ жизни [А.А. Лебедь и соавт. 2010]. У них регистрируются исходные полипатии в результате алиментарного истощения [S.E. McIntosh, et al. 2014; W.J.

Mohr et al. 2009; H. Yanagisawa 2013]. Чаще всего поражение происходит под действием различных отравляющих веществ и в состоянии алкогольной интоксикации [А.А. Лебедь и соавт. 2010]. Действие алкоголя приводит к утрате самоконтроля, угнетает центр терморегуляции, способствует развитию гиперкоагуляции и гипогликемии [O. Goertz et al. 2009; А.А. Лебедь и соавт. 2010].

В середине XX века было высказано предположение об основной роли дисфункции эндотелиальных клеток и микроциркуляции в патогенезе многих заболеваний [Л.В. Васина и соавт. 2017; P. Rajendran 2013; R.F. Furchgott et al. 1980]. При этом взгляды на его функцию претерпевают значительные изменения [S. Blankenberg et al. 2000, ].

В настоящее время эндотелий рассматривается не только как гематотканевой барьер, но и, в большей степени, как нейроэндокринный орган [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003; О.Е. Анциферова и соавт., 2018], который выполняет ряд функций: регуляцию микрокровотока, тромбогенности и тромборезистентности, тонуса и роста сосудов, межклеточную адгезию и пр. Регуляция данных процессов происходит посредством инкретируемых эндотелием сосудов биорегуляторов. Под дисфункцией эндотелия понимают дисбаланс инкреции вазодилатирующих и вазоконстрикторных медиаторов [Ю.С. Винник и соавт, 2014; Ю.А. Витковский и соавт., 2010; Ю.Г. Шапкин и соавт., 2014; L. Cotrim-Sousa et al., 2019, A.D. Blann et al., 2000]. Роль эндотелиальной дисфункции установлена при сердечно-сосудистой патологии, сахарном диабете, гломерулонефрите и прочих состояниях [М.Т. Рахиджанова и соавт, 2014; Л.А. Руюткина и соавт., 2018; N.R. Bhokta et al., 2011].

В настоящее время активно изучаются нарушения микроциркуляции и дисфункция эндотелия у пациентов с артериальной гипертензией [М.М. Tuscureanu et al., 2019; D. A. Morrow et al., 2008], ишемической болезнью сердца [Ж.С. Филиповская и соавт., 2016; T. Gui et al., 2012; D. Milenkovic et al., 2019], гестозами [М.Т. Рахиджанова и соавт, 2014; Л.Н. Сивицкая и соавт., 2014; О.А. Анциферова и соавт., 2018; M. D. Savvidou et al., 2003], сахарном диабете [Л.В.

Васина и соавт. 2017]. Авторы приходят к общему мнению относительно ключевой роли нарушений микроциркуляции и эндотелиальной дисфункции в патогенезе изучаемой патологии. Поэтому в настоящее время дисфункция эндотелия рассматривается как универсальное неспецифическое звено в механизмах многих заболеваний [P. Rajendran. et al., 2013].

В научной литературе описаны десятки биологически активных веществ, обеспечивающих выполнение основных функций эндотелия – вазомоторной, гемостатической, адгезивной и ангиогенной [Н.Н. Петрищев, 2003; М.И. Михайличенко и соавт., 2020; S. Blankenberg et al., 2001].

Основными факторами, в том числе влияющими на функциональную активность эндотелия, являются гемодинамические условия (скорость сдвига, давление), газовый состав крови, гормоны и медиаторы — катехоламины, вазопрессин, ацетилхолин, эндотелин, брадикинин, ангиотензин II, тромбин, цитокины, липопротеины, эндотоксины и др. [H. Strijdom et al. 2012; R. F. Furchgott, 1980].

При длительной стимуляции эндотелия происходят рецепторные, биохимические и микроструктурные изменения, приводящие к нарушению реактивности, истощению, структурным перестройкам и необратимому повреждению эндотелиальных клеток [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003].

Исследования изменений периферической иннервации и микроциркуляторного русла при холодовой травме конечностей весьма перспективны, что объясняется ее большим значением в диагностике и оценке последствий местной холодовой травмы [Шаповалов К.Г. и соавт., 2010, Коннов В.А. и соавт. 2014; G. Ferrara, 2016]. Тем не менее, работы по данной тематике в современной литературе представлены скудно и недостаточно систематизированы.

### **Степень разработанности темы**

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении патогенеза и лечения отморожений, многие вопросы остаются открытыми и требуют

дальнейшей разработки с внедрением в практическое здравоохранение. Врачи практического звена нуждаются в совершенных прикладных патогенетически обоснованных алгоритмах лечения пациентов с местной холодовой травмой, так как в настоящее время не существует классификации осложнений и последствий отморожений, четких сроков и показаний к оперативному лечению криотравмы. Регламентированная тактика обоснована, однако частая инвалидизация, наличие и высокий процент послеоперационных осложнений требует разработки новых способов и прикладных компьютерных программ ранней диагностики как глубины поражения, так и возможных рисков послеоперационного периода, а также новых способов комплексного лечения холодовой травмы.

### **Цель работы:**

На основе расширения представлений о патогенетических и клинических закономерностях разработать прогностические критерии осложнений и улучшить исходы местной холодовой травмы.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить электронейромиографические потенциалы у пациентов в разные сроки криоповреждения конечностей.
2. Изучить динамику маркеров нейродеструкции (сывороточного кальпротектина, периферического нейрофиламента) при отморожениях.
3. Исследовать состояние микроциркуляторного русла и компонентов регуляции сосудистого тонуса у пациентов с криотравмой.
4. Определить активность матриксных металлопротеиназ 2, 9 и их ингибиторов в крови при отморожениях.
5. Изучить динамику уровня оксида азота, асимметричного диметиларгинина, количества циркулирующих эндотелиальных клеток в кровотоке у пациентов с криоповреждением в зависимости от объема пораженных тканей и периода отморожений.



6. Установить уровень миелопероксидазы, лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов и содержания адгезивных молекул (sP-Sel, sE-sel, CD40L, ICAM-1, VCAM-1) в периферической крови больных с криоповреждением.

7. Создать модели прогнозирования течения и исходов криоповреждения, а также разработать классификацию осложнений криотравмы.

### **Научная новизна**

Впервые установлено, что у пациентов с криоповреждением в крови возрастает содержание маркеров периферической нейродеструкции (сывороточный кальпротектин и периферический нейрофиламент).

Впервые выявлено, что при отморожениях изменяются показатели неинвазивной электронейромиографии: амплитуда М-ответа и скорость распространения возбуждения снижались, а резидуальная латентность повышалась. Увеличение массива пораженных холодом тканей сопровождается усугублением периферического нейромоделирования.

Впервые выявлено, что в ранние сроки в крови пострадавших с отморожениями увеличивается активность матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, причем снижения их уровня не отмечено в более поздние периоды криотравмы. Увеличение объема пораженных холодом тканей сопровождается повышением в крови уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов.

Впервые продемонстрировано, что при отморожениях происходит гиперсекреция молекул межклеточной адгезии (sP-Sel, sE-sel, CD40L, ICAM-1, VCAM-1), асимметричного диметиларгинина и миелопероксидазы на 5 и 30 сутки с момента криотравмы, которая зависит от объема пораженных холодом тканей. Впервые выявлена обратная связь между содержанием асимметричного диметиларгинина и масштабом альтерированных холодом мягких тканей.

Впервые в качестве прогностического критерия осложненного течения послеоперационного периода и упрощения прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III–IV степени дистальных сегментов нижних конечностей выбран способ неинвазивной электронейромиографии.

Впервые дана оценка значимости параметров электронейромиографии нижних конечностей при их отморожениях (амплитуда М-ответа, резидуальная латентность, скорость распространения возбуждения) на основе построения математической модели, основанной на методах линейной регрессии.

На основе полученных данных предложен способ прогнозирования осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме, позволяющий выделить группу больных, которым требуется коррекция проводимой терапии в послеоперационном периоде (патент РФ № 2712572).

На материалах исследования разработан способ прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей, что позволяет своевременно определить условную линию демаркации, а также планировать сроки и объем необходимого лечения, и как следствие, профилактировать развитие послеоперационных осложнений (патент РФ № 2704785).

Разработана классификация осложнений местной холодовой травмы, которая имеет патогенетическое, методическое и организационно-экономическое значение. Для отдаленного периода криотравмы предложено понятие «холодовой конечности» и определены патогенетические и клинико-инструментальные критерии ее нейропатической, ишемической и смешанной форм. В ранние сроки криоповреждения у пострадавших наиболее часто выявляются нарушения чувствительности пораженной конечности, мышечная слабость, судороги, нарушение координации движений. В поздние сроки наблюдается отторжение трансплантата, нагноение, несостоятельность швов и некроз культи. В отдаленном периоде возможны трофические нарушения, остеомиелит и гангрена дистального сегмента пораженной конечности.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Выявлена периферическая нейропатия у пострадавших, ремоделировании межклеточного матрикса и коллагена, состоянии микроциркуляции, системы гемостаза, лимфоцитарно-тромбоцитарной коагрегации, экспрессии молекул

межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина. Выявленные изменения расширяют представления о патогенезе холодовой альтерации, а также скорректировать комплексные подходы к терапии пострадавших.

На основании результатов исследования созданы две программы для ранней диагностики уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени. Программы носят прикладной характер, обеспечивают возможность ранней диагностики уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени, что позволяет не только в полной мере информировать пациента, но и оптимизировать тактику их ведения (свидетельство о регистрации программы ЭВМ № 2019666297; свидетельство о регистрации программы ЭВМ № 2019612961).

При изучении осложнений местной холодовой травмы выявлено, что у пациентов наиболее часто встречаются нарушения чувствительности пораженной конечности (100%), судороги (87%), нарушение координации движений (100%), а также отторжение трансплантата (12,5%), нагноение, несостоятельность швов (15,6%), формирование некроза культи (6,3%); а также - трофические нарушения (32%), остеомиелит (28%) и гангрена дистального сегмента пострадавшей конечности (12%).

### **Методология и методы исследования**

Проведено одноцентровое проспективное открытое нерандомизированное контролируемое сравнительное интервенционное исследование.

В диссертации реализован комплексный и системный подход изучению и оценке маркеров периферической нейродеструкции, молекул межклеточной адгезии и межклеточных взаимодействий, асимметричного диметиларгинина, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, а также биомаркеров цитолиза и цитотоксичности у пациентов с отморожениями.

Использованы лабораторные методы твердофазного специфического иммуноферментного анализа, проточной цитометрии с применением

диагностического планшета LEGENDplex™ фирмы BioLegend (San-Diego, CA92121, USA, 2019); оценка феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной коагрегации осуществлялось по оригинальному методу профессора Ю.А. Витковского (1999 г.); количество десквамированных эндотелиоцитов в крови определялось методом Hladovec (1978); определение нитритов крови осуществлялось непрямым методом Голикова П.П. и соавт. (2004).

Лабораторный кластер работы сопровождался и дополнялся заключениями неинвазивной электронейромиографии с использованием аппарата Нейро-ВМП компании Нейрософт (г. Иваново) (ООО «Нейрософт, № ФСР 2011/12846), а также лазерной доплеровской флуометрией с применением лазерного анализатора микроциркуляции ЛАКК – 02 (ООО научно-производственное предприятие «ЛАЗМА», № о21524: 29/03020703/5555-03).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты данного исследования применяются в комплексной терапии пострадавших в краевом ожоговом центре г. Читы, а также 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 всех специальностей.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При отморожениях конечностей отмечается снижение биоэлектрической активности мышц, а также повышение в кровотоке уровня периферического нейрофиламента. Происходит существенная дезорганизация нейродинамики, изменение биомеханизма мышечного сокращения, и, как следствие, замедление процессов репарации. У пациентов с отморожениями изменяются параметры микроциркуляции и сосудистого тонуса.

2. При местной холодовой травме происходит ремоделирование тканей зоны повреждения. Выявлена прямая сильная связь между уровнем холодового

поражения конечности и активностью процессов конформации межклеточного матрикса.

3. В патогенезе отморожений существенное значение имеет эндотелиальная дисфункция. Объем пораженных тканей прямо пропорционален уровню циркулирующих в крови маркеров повреждения эндотелия, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, периферического нейтрофиламенты, миелопероксидазы, растворимых форм молекул межклеточной адгезии, сывороточного кальпротектина и асимметричного диметиларгинина.

4. Местная холодовая травма сопровождается деградацией периферических нервов. Для прогнозирования осложненного течения послеоперационного периода и упрощения прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III–IV степени дистальных сегментов нижних конечностей обоснован метод электронейромиографии.

### **Благодарности**

Выражаю признательность Заслуженному врачу России, заведующему кафедрой анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ, доктору медицинских наук, профессору Шаповалову Константину Геннадьевичу за оказанную помощь в работе, ценные советы и научные идеи; доценту кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ, кандидату медицинских наук Мудрову Виктору Андреевичу за помощь в статистической обработке материала; заведующей краевым ожоговым центром ГУЗ ГKB №1 Михайличенко Анне Викторовне за помощь в сборе и кумуляции биологических образцов и всестороннюю поддержку на всех этапах исследования.

### **Степень достоверности и апробация основных положений работы**

Основные научные положения, цели и задачи, выводы, а также практические рекомендации научного труда обоснованы применением современных методов оценки дисфункции эндотелия, нарушения нервной проводимости и дисбаланса

микроциркуляции у пациентов с криоповреждением, статистической обработкой полученных результатов с применением большого количества компьютерных программ и приложений. Вышеперечисленные сведения позволили диссертанту сформулировать объективные выводы, определенные высокой точностью полученных данных, а также указать на высокую научную и практическую значимость исследования. Полученные результаты сопоставимы с немногочисленными результатами работы отечественных и зарубежных исследователей.

Результаты исследования доложены на Всероссийской научно-практической конференции анестезиологов и реаниматологов (Чита, 2020); Всероссийской научно-практической конференции анестезиологов и реаниматологов (Чита, 2019); Всероссийской научно-практической конференции анестезиологов и реаниматологов (Чита, 2021); на заседании Общества хирургов Забайкальского края (Чита, 2019); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 55-летию Читинской государственной медицинской академии (Чита, 2008); на Межобластной научно-практической конференции травматологов и ортопедов Дальнего Востока, Восточной Сибири, Якутии (Благовещенск, 2005); на I съезде комбустиологов России (Москва, 2005); первом Дальневосточном ангиологическом форуме с международным участием (Хабаровск, 2008); на Всероссийской научно-практической конференции «Современные представления об иммунокоррекции» (Пенза, 2008); на II съезде физиологов СНГ (Кишинев, 2008); на заседании Читинского отделения физиологического общества имени И.П. Павлова (Чита, 2009).

### **Личный вклад автора**

Диссертант самостоятельно провел поиск и анализ современных источников литературы, а также выбрал и сформулировал тему диссертационного исследования, заниматься которой начал еще будучи студентом. Роль соискателя в диссертационном исследовании является главенствующей и основной, заключается в постоянном участии на всех этапах научного труда: в определении

направления дизайна исследования, формулировке целей, задач и выводов исследования, реализации теоретической и клинико-инструментальной составляющей, написании публикаций по материалам диссертации, а также обсуждении полученных результатов на научно-практических конференциях. Соискателем проведено обследование пострадавших с местной холодовой травмой конечностей, а также выбор, назначение соответствующей комплексной терапии согласно сформированным клиническим рекомендациям по проблемам отморожений, проведение и интерпретация лабораторных показателей, полученных результатов инструментальных методов диагностики нарушения периферической иннервации (ЭНМГ), апробирование и внедрение их в практическую работу Краевого ожогового центра г. Читы, а также теоретическую работу на кафедрах патологической физиологии и травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия МЗ РФ.

Лабораторные исследования проведены на базе лаборатории клинической и экспериментальной биохимии НИИ Медицинской экологии ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ. Инструментальные исследования проведены на базе отделения функциональной диагностики ГУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Читы. Статистическая обработка результатов исследования проведена совместно с доцентом кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ, к.м.н. В.А. Мудровым.

Диссертационные исследования полностью описаны и опубликованы в научных публикациях автора.

### **Соответствие содержания диссертации паспорту специальности**

Указанная область диссертационного исследования, представленного Михайличенко М.И., соответствует паспорту специальности 14.03.03 - Патологическая физиология (3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки), согласно приказа № 118 «Об утверждении номенклатуры научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени, и внесении

изменения в Положении о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденное приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 10 ноября 2017 г. № 1093» от 24 февраля 2021 г.), а именно пункту 1: «исследование особенностей этиологических факторов, обуславливающих их патогенное воздействие на организм, и характера взаимодействия этих факторов с рецепторными системами организма», пункту 2: «изучение общих патогенетических механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенного фактора, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний», пункту 3: «анализ механизмов саногенеза, направленных на предотвращение повреждающего действия патогенного агента на организм, его органы и системы, изучение причин и особенностей взаимной трансформации саногенетических и патогенетических механизмов», пункту 5: «изучение механизмов, лежащих в основе различных исходов и осложнений болезни; анализ причин развития неполного выздоровления и формирования на этой основе последующего состояния предболезни», пункту 7: «изучение механизмов развития заболеваний при воздействии на организм неблагоприятных экологических факторов; исследование роли хронобиологической составляющей в динамике патологических процессов и защитно-приспособительных реакций», пункту 9: «изучение этиологии, патогенетических и саногенетических механизмов при заболеваниях конкретных органов и систем, а также патогенетических основ их клинической симптоматики».

Диссертация выполнена согласно плану научных исследований ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия Минздрава России. Тема диссертации и научный консультант утверждены на заседании Ученого совета ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России от 15 января 2019 года, протокол №5, регистрационная карта РК 040(10) АААА – А – 17 – 117030310232 – 5.



## **Публикации**

По результатам исследования автором опубликовано 40 работ, в том числе: 4 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 11 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus; 10 иных публикаций по результатам исследования; 3 патента; 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ; 10 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертационное исследование изложено на 215 страницах машинописного текста и состоит из введения, 10-ти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, опубликованных по теме диссертации научных работ и списка литературы. Список литературы включает 339 источников, из них 62 – на русском и 277 – на иностранных языках. Текст иллюстрирован 36 таблицами и 15 рисунками.

Исследовательская работа выполнена на базах кафедры факультетской хирургии с курсом урологии и кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, краевого ожогового центра на базе «Городской клинической больницы №1» г. Читы.

## ГЛАВА 1. Обзор литературы.

### Патогенез и лечение местной холодовой травмы

#### 1.1. Историческая справка

Самые ранние документальные свидетельства о местной холодовой травме датируются 5 веком до нашей эры, а именно манускриптами, найденными вблизи мумий, обнаруженных в горах Чили [P. W. Post et al., 1972]. Археологи описывают признаки отморожений: отсутствие фаланг пальцев в области стоп и кистей, наличие импровизированных повязок в проекции пораженной конечности [Lankford. H. V. et al. 2016; Cauchy E. et al. 2013]. Более свежие описания травматизма от переохлаждения сосредоточены вокруг военных кампаний, от работ Ксенофонта 210 г. до н. э. до отчетов доктора Джеймса Тэтчера во время американской революции и случаи войны в Корее и Фолклендских островах [Lankford H. et al., 2016]. Барон Доминик Ларрей, военный хирург Наполеона, дал первое описание патофизиологии обморожения во время печально известного отступления 1812 года из Москвы [Larrey D. J. et al. 1974]. Он писал: «Естественное тепло поглощается и выделяет калорийность. Поры закрываются и капиллярные сосуды впадают в состояние сжатия; жидкости конденсируются и текут значительно медленнее». По сути Ларрей своими трудами заложил фундамент современных представлений о патогенезе местной холодовой травмы, отметил неблагоприятное явление в виде «замораживание-оттаивание-согревание» и одним из первых предложил теплосберегающие повязки, используемые широко и по сей день.

Экстремальные последствия холода подробно описаны и во время мировых войн XIX-XX веков [K. M. Neil et al., 2016; E. Jorum et al., 2019; A. J. Norheim et al., 2018]. Многие из этих травм были получены при сравнительно «высоких» температурах, имели общие черты холодовой травмы, были вызваны длительным

погружением в холодную воду (1,6–4,4°C). Это привело к появлению термина «траншейная стопа» [Nyssen A., 2020; Padeh S. et al., 2013; T. Powell, 2020].

Подробно изучено так называемое «высотное» отморожение, впервые описанное в 1943 году. Подобная ситуация обнаружена у летчиков Второй мировой войны. Установлено, что экипажи тяжелых бомбардировщиков получили травм от низких температур больше, чем от каких-либо других [Vale A.T. et al., 2017]. Воздействие холода отмечено и в корейской войне [L. Cutter et al., 2015]. «Траншейная стопа» выявлена у солдат, подвергшихся постоянной влажности при сравнительно теплой температуре воды 7,8°C и имела много общего с ранними холодными травмами. Во время Фолклендской кампании 1982 г. британские и аргентинские военнослужащие сообщили о сходных травмах [R. P. Craig et al., 2007; A. Hall et al., 2018].

При этом методы лечения отморожений оставались практически неизменными со времен Ларрея. Однако в 1956 году канадский хирург Хэмилл впервые предпринял попытку быстрого разогрева пораженных тканей до 37,8°C. Полученные им результаты оказались неутешительны [Larrey D. J. et al. 1974]. С тех пор подходы к комплексному лечению криотравмы и поиск новых патогенетических механизмов криодеструкции явились краеугольным камнем для многих специалистов.

## **1.2. Эпидемиология местной холодовой травмы**

Высокий процент пострадавших в мирное время, сложность лечения и длительная утрата трудоспособности выводят материальные затраты на комплексную терапию пациентов в лидирующие позиции, которые в 3 раза превышают стоимость лечения общехирургического больного [А.Л. Чигунадзе, 2016; E. Cauchy et al., 2016]. При этом средние сроки лечения от местной холодовой травмы более чем в 2,5 раза превышают длительность лечения больных с термическими поражениями [Norheim A. J. et al., 2017, Sokolov V. et al., 2017; B. Higdon, 2015]. При отморожениях III-IV степени сроки лечения

варьируют в пределах от 35 до 77 дней [А. Л. Чигунадзе и соавт., 2016; A. N. Fiutko et al., 2020; A. Carceller et al., 2019]. Вызывают опасения и результаты лечения: инвалидизация при местной ходовой травме составляет от 20% до 50%, а при глубоких отморожениях от 70% до 94% [Шаповалов К.Г. и соавт., 2010; M. Bozkurt et al., 2017].

Послеоперационные осложнения наблюдаются практически в 90% случаев после оперативных пособий у пациентов с глубокими отморожениями. На первое место среди осложнений выходят длительно незаживающие язвы культи смешанного генеза, несостоятельность сформированной культи, остеомиелиты пораженного сегмента, холодовой нейроваскулит [J. W. Castellani et al., 2006]. Адекватная коррекция осложнений практически невозможна и, зачастую, заканчивается неблагоприятно [S. L. Khan et al., 2019; V. Bednarz, 2019].

Необходимо указать и на сложность ранней диагностики и маловыраженность клинических проявлений поражения в ранние периоды криотравмы. В связи с этим, действующая в настоящее время классификация холодовой травмы, отражающая степень поражения тканей и периодичность течения, не может быть применена в полной мере для построения точного диагноза и формирования клинико-статистических групп [Шаповалов К.Г. и соавт. 2010; Сизоненко В.А. и соавт., 2003]. В частности, в современной классификации полностью отсутствует рубрификация осложнений местной ходовой травмы. Это существенно затрудняет положение врачей при определении показаний для госпитализации и выборе тактики лечения.

В этой связи последние годы отмечены углублением исследований отечественных и зарубежных авторов по вопросам патогенеза холодовой травмы, ранней диагностики глубины поражений тканей, способов хирургического лечения глубоких отморожений конечностей и реабилитации [Шаповалов К.Г. и соавт., 2007; Томина Е.А. и соавт., 2008; Винник Ю.С. и соавт., 2011; E. E. Voes et al., 2016; K. J. Bruen et al., 2007].

### **1.3. Теория прямого повреждения клеток и последующей «кожной» ишемии**

В настоящее время все теории альтерации при криоповреждении сводятся к двум основным знаковым периодам и пытаются раскрыть происходящее в тканях во время замерзания и после согревания.

Замораживание тканей первоначально приводит к образованию внеклеточных кристаллов льда. Эти кристаллы непосредственно повреждают клеточные мембраны с изменением осмотический градиента, приводя к внутриклеточной дегидратации [R. L. Sheridan et al., 2009; S. Irarrazaval et al., 2018].

При дальнейшем падении температуры продолжается дальнейшее образование внутриклеточного льда. Ледяные кристаллы расширяются, вызывая механическое разрушение клеток [S. Tavri et al. 2016]. Первоначально организм реагирует на охлаждение чередованием циклов сужения и расширения сосудов. Этот феномен описан некоторыми авторами как «охотничья реакция» [R. L. Sheridan et al., 2009].

С расширением сосудов приходит и восстановлением температуры тканей до условно нормальной начинается повторный каскад разрушения клеток. Про эти неблагоприятные последствия и описал в своих трудах барон Ларрей [Larrey D. J. et al. 1974]. Начинается выраженное тромбообразование в очаге альтерации [L. Gouillon et al., 2017]. Попытки предотвратить регионарный тромбоз с помощью антикоагулянтов и прочих препаратов, влияющих на реологию крови, имеют неоднозначные исходы, как и попытки раннего, профилактирующего периферического вазоспазм, оперативного лечения в виде симпатэктомии [Шаповалов К.Г. и соавт., 2007; A. Golant et al., 2008; A. Stjernbrandt et al., 2018]. Это указывает на то, что системы, отличные от коагуляции, опосредуют этот сложный и неизученный по сей день процесс.

Механизм прогрессирующего ишемического повреждения, наблюдаемый при холодовой травме, демонстрирует заметное сходство с тем, что наблюдается при термических повреждениях. Многочисленные исследования ожоговых повреждений предоставили значительные доказательства относительно роли

медиаторов воспаления, таких как простагландины, тромбоксаны, брадикинин и гистамин [Шаповалов К.Г. и соавт., 2008; V. Sokolov et al., 2007]. По мнению авторов, подобные биологически активные вещества формируют отек и способствуют повреждению эндотелия с последующим прекращением регионарного кровотока, формированием так называемой «зоны ишемии Джексона» [J. Gorjanc et al., 2018; V. R. Belum et al., 2016].

Однако, клеточный аутолиз, доказанный у пациентов с местной холодовой травмой, изучен недостаточно, а последующий «биологический взрыв» требует большей конкретики.

#### **1.4. Экспериментальные исследования по проблеме местных поражений холодом**

Клинические наблюдения и исследования не позволяют раскрыть в полной мере механизмы патофизиологических изменений в тканях, поврежденных низкой температурой. Это связано с поздним обращением большинства пострадавших с отморожениями в стационар, невозможностью стандартизировать сопутствующие травме факторы, ограниченностью использования инвазивных методов исследования у людей. Несмотря на определенные видовые особенности терморегуляции, острые опыты выполнялись на различных животных: собаках, кроликах, крысах. При этом исследовались как патогенетические процессы в тканях, подвергавшихся действию холода, так и методы адекватного восстановления температуры и обмена веществ.

При этом необходимо указать, что отморожение представляет собой двоякую ситуацию: от необратимого клеточного разрушения к обратимому, и изменения, наблюдаемые после согревания. В последнее время точные патогенетические механизмы криотравмы является предметом все более пристального изучения. По-видимому, за это ответственны два разных механизма альтерации: гибель клеток, происходящая во время воздействие холода и некроз, связанный с прогрессирующей ишемией пораженного сегмента [Шаповалов К.Г. и соавт., 2007].

Теорема о «зоне ишемии Джексона» побудила исследователей изучить роль медиаторов воспаления при местной холодовой травме. В основополагающих работах с использованием классической модели «отмороженного» кроличьего уха, выявлен повышенный уровень простагландина и тромбоксана A<sub>2</sub> (в патологическом экссудате при отморожении) [G. Martinez Villen et al., 2002]. Полученные результаты полностью совпадают с результатами их исследования ожоговой альтерации [V. Sokolov et al., 2017]. Следующим этапом работы авторов явились попытки ингибиции продукции эйкозаноидов. Установлено, что ингибирование экспрессии тромбоксана A<sub>2</sub> значительно влияет на перфузию дермы и репарацию тканей у экспериментальных животных с ожогами и отморожениями. Аналогичным образом, Fallahi et al. (2017) обнаружил значительное улучшение репарации тканей в пораженном холодом ухе кролика при использовании ингибиторов простагландина и тромбоксана. Вышеперечисленные авторы пришли к выводу о решающей роли тонуса сосудов в течении отморожений.

Для дальнейшего изучения тонуса сосудов в различные сроки после отморожения использовался метод перфузии изолированных сосудов по Кравкову [Шаповалов К.Г. и соавт., 2009; Вахнин В.М. и соавт., 2007]. Результаты исследования показали, что тонус сосудов повышался в первые часы и дни после отморожения, а к 10-м суткам спазм сменялся параличом сосудов. Для объяснения спастического состояния выполнялись эксперименты по определению реакции сосудов на прессорные и депрессорные вещества. Исследования показали, что введение ацетилхолина сопровождается незначительным по сравнению с контролем расширением сосудов. Добавление в перфузат адреналина приводит в различные сроки после отморожения к более резкому спазму, чем в контроле. При этом реакция сосудов выражена сильнее в виде сужения на адреналин, чем расширения на ацетилхолин [Е.А. Томина, 2008].

В работах с животными значительное внимание уделялось патогенезу интоксикации при местных поражениях холодом. Установлено, что токсемия имеет свою особенность по сравнению с таковой при ожогах [V. Sokolov et al.,

2017; L. J. Auerbach et al., 2013]. Начинаясь в раннем реактивном периоде, она более продолжительна при обширных и глубоких отморожениях. При поражениях холодом III-IV степени, в отличие от ожогов, глубокие ткани некротизировались медленнее, а сохранявшийся в них минимальный кровоток, хотя и не обеспечивал полностью их жизнеспособность, достаточен для поступления в организм токсинов в обильном количестве. Для определения характера токсемии и времени ее развития кроликам-реципиентам внутривенно вводился экстракт кожи конечности кроликов-доноров, подвергшихся отморожению. Гомогенат из интактной кожи оказывал местное сосудорасширяющее действие, а из тканей зоны криодеструкции обладал прессорными свойствами. Обнаружено, что основным действующим началом при токсемии являлись низкомолекулярные продукты распада белков, гистаминоподобные и другие биологически активные вещества. Однако полностью природа этих токсинов при отморожениях до настоящего времени не выяснена. Синдром токсемии после воздействия холода в эксперименте развивался с первых минут после восстановления температуры тканей и длился до образования демаркационной линии. Токсины, поступавшие в общий кровоток, провоцируют тяжелейшие функциональные изменения сердечно-сосудистой и центральной нервной системе. Введение интактным животным большого количества токсина из тканей зоны криоповреждения приводило к морфологическим изменениям их органов, аналогичным тем, что наблюдались после обширных и глубоких отморожений. Резорбция токсических веществ из зоны поражения холодом в общий кровоток приводила к значительным морфологическим изменениям в тканях внутренних органов [G. Martinez Villen et al., 2002; J. J. Cubitt et al., 2007; L. Cutter et al., 2015].

Вместе с тем результаты, полученные в эксперименте над животными различных видов, можно экстраполировать на процессы при криовоздействии на организм человека, с учетом видовых особенностей и известной долей условности.

В патогенезе отморожения, как и любого повреждения, важная роль принадлежит гипоксии тканей, в том числе тканевой [С.А. Сумин и соавт., 2019].



В эксперименте установлено, что через час после начала действия низких температур степень насыщения кислородом артериальной крови не изменялась, а в последующем отмечалось ее незначительное снижение. Содержание кислорода в венозной крови резко увеличивалось уже через час после отморожения, оставаясь на этих же величинах и к концу эксперимента. Соответственно этому артериовенозная разница кислорода крови уменьшалась. В реактивном периоде отморожения содержание кислорода в венозной крови падало, однако не достигало контрольной величины. То есть, при действии низких температур угнеталась деятельность тканевых ферментов, что приводило к снижению утилизации кислорода крови в связи с раскрытием артериоловеноулярных анастомозов, по которым проходит кровь, минуя капиллярную сеть [А.В. Хапкина и соавт., 2017; А.И. Крупаткин и соавт., 2013].

С помощью микроскопического изучения кровообращения в сосудах уха кролика установлено, что в первые часы после отморожения наблюдался стаз в капиллярах соответственно тяжести повреждения и времени воздействия низких температур. После согревания кровообращение восстанавливалось во всех сосудах уха, но уже через 10 минут начинался парез капилляров и стаз крови, сопровождавшийся выходом жидкости в прекапиллярное русло, а в капиллярах развивалась агрегация эритроцитов. Кровообращение в отмороженных участках в период развития стаза происходило через артериовенозные анастомозы. Кроме того, при экспериментальном отморожении у кроликов отмечалось, что тромбоз сосудов никогда не появлялся раньше 24 ч после отморожения, а чаще даже спустя 48 ч с момента травмы [G. Martinez Villen et al., 2002; H. A. Daanen et al., 2005; A. Martel-Arquette et al., 2016].

Необходимыми предпосылками для всякого тромбообразования являются изменения стенок сосуда, скорости кровотока, состояния систем свертывания крови и фибринолиза. При различных заболеваниях и травмах нарушается процесс взаимодействия прокоагулянтного и антикоагулянтного звеньев [Б.И. Кузник и соавт., 2012; N. M. Antonijevic et al., 2017]. Для изучения свертывающей системы крови у экспериментальных животных при отморожении использовался

метод коагулограмм и тромбозэластографии [G. Martinez Villen et al., 2002; J. Hu et al., 2016; T. Aizawa et al., 2019; L. Su et al., 2017; P. Wohlsein et al., 2016]. При исследовании отмечалось повышение числа тромбоцитов, увеличение уровня фибриногена, появление продуктов паракоагуляции. Обнаруживалось, что укорачивалось начало и конец свертывания крови, протромбиновое время, время рекальцификации. Антисвертывающая система крови при отморожении снижала свою активность [M. S. Miao et al., 2018].

Резюмируя данные экспериментальных исследований, можно считать первые 5 суток после действия низких температур наиболее опасным временем для развития внутрисосудистого тромбоза, который связан с «цитокиновым стрессом», нарушением микроциркуляции и комплексному сбою системы гемостаза в очаге альтерации и перифокально.

Необходимо указать на существующий длительное время инструментальный способ, оценивающий функцию периферической нервной системы и мышечное возбуждение, а именно – на электронейромиографию. Способ имеет простое исполнение, эффективность его доказана в ходе диагностики многих патологических состояний, сопровождающихся деградацией периферических нервов [А. Г. Ремнев и соавтр., 2013]. Логично предположить, что местная криотравма всегда протекает с поражением нервной ткани, которая, как известно, провоцирует постальтерационные осложнения при многих заболеваниях. Однако, данный метод инструментальной диагностики не использовался у пациентов с местной холодовой травмой.

### **1.5. Повреждение и дисфункция эндотелия при отморожениях**

Вследствие холодового воздействия происходят нарушения гемореологии в пораженных сегментах, что приводит к тромбозам и некрозу пораженных тканей конечностей. Дальнейшее течение раневого процесса сопровождается развитием инфекционно-воспалительных осложнений и существенной утратой трудоспособности [В.А. Сизоненко и соавт., 2003; К.Г. Шаповалов и соавт., 2008;

E. De Buck et al., 2017; B. Higdon et al., 2015; J. Haik et al., 2016].

Значительное количество пациентов с местной холодовой травмой имеет неблагоприятный преморбидный фон. Важным в эпидемиологии криоповреждения является асоциальный образ жизни пациентов. У пострадавших выявляются выраженные полипатии из-за алиментарного истощения. Регулярно повреждение холодом происходит в состоянии опьянения различного генеза. [Ю.С. Винник и соавт., 2014; Лебедь А.А. и соавт. 2010].

В середине XX века было высказано предположение об основной роли эндотелиальных клеток и микроциркуляции в патогенезе многих заболеваний [Винник Ю. С. и соавт., 2011; L. J. Ignarro et al., 1987; S. R. Thom, 2011]. При этом взгляды на его функцию претерпевают значительные изменения [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003; М.И. Михайличенко и соавт., 2020].

В научной литературе описаны десятки биологически активных веществ, обеспечивающих выполнение основных функций эндотелия – вазомоторной, гемостатической, адгезивной и ангиогенной [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003].

Основными факторами, в том числе влияющими на функциональную активность эндотелия, являются гемодинамические условия (скорость сдвига, давление), газовый состав крови, гормоны и медиаторы — катехоламины, вазопрессин, ацетилхолин, эндотелин, брадикинин, ангиотензин II, тромбин, цитокины, липопротеины, эндотоксины и др [Б.И. Кузник и соавт., 2014].

При длительной стимуляции эндотелия происходят рецепторные, биохимические и микроструктурные изменения, приводящие к нарушению реактивности, истощению, структурным перестройкам и необратимому повреждению эндотелиальных клеток [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003; Л.В. Васина и соавт., 2017].

В настоящее время эндотелий рассматривается как гематотканевой барьер и важнейший нейроэндокринный орган, выполняющий ряд функций: регуляцию микрокровотока, тромбогенности и тромборезистентности, тонуса и роста сосудов, межклеточную адгезию и пр. Регуляция метоболических процессов происходит за счет инкреции эндотелием сосудов важнейших биорегуляторов.

Под дисфункцией эндотелия принято понимать нарушение в инкреции вазодилатирующих и вазоконстрикторных медиаторов, , либо реализующих свое действие на их поверхности [Ю.С. Винник и соавт., 2014].

Установлено, что в механизмах развития патологии при отморожениях важное место занимают процессы альтерации эндотелия параллельно с его дисфункцией [A. Bhatnagar et al., S. Moncada et al., 1977], так как эндотелиальные клетки сосудов ввиду высокой дифференцировки очень чувствительны к действию низких температур [U. Dobnikar et al., 2009]. При этом наблюдаются серьезные сдвиги свертывающей системы крови, фибринолиза и нарушения тканевого обмена [Ю. С. Винник и соавт., 2014; J. Drinane et al., 2019].

Известным маркером повреждения и дисфункции эндотелия являются его десквамированные клетки. Установлены механизмы атерогенеза на фоне их повышенной циркуляции в кровотоке [Н.Н. Петрищев и соавт., 2007]. Показано, что максимальное увеличение слущенных эндотелиальных клеток выявлено в раннем реактивном периоде отморожений [Ю.С. Винник и соавт., 2014; P. R. Dipak et al., 2015; A. I. Franco Moreno et al., 2018]. Это, по мнению авторов, является последствие альтерации холодом и неизбежно ведет к значительному повышению уровня провоспалительных цитокинов. Количество эндотелиоцитов возрастает при увеличении тяжести криотравмы. В позднем реактивном периоде содержание циркулирующих эндотелиальных клеток снижается по сравнению с более ранними сроками. В дореактивном периоде происходят повреждение эндотелия и сбой секреторной функции. Предиктором формирования нарушений микроциркуляторного гемостаза, акселерации воспалительной реакции при криоповреждении, вероятно, является повреждение эндотелиальных клеток.

Эндотелиоциты принимают активнейшее участие в регуляции сосудистого тонуса, инкретируя, в частности, оксид азота (NO) и его производные [L. J. Ignarro et al., 1987; Л.В. Васина и соавт., 2017]. В дореактивном периоде на фоне снижения скоростных показателей кровотока и отсутствия продуктов воспаления в общий кровоток уровень метаболитов оксида азота сравним с показателями контрольной. Вероятно, это исходный уровень нитритов, имевший место до

холодовой травмы. В раннем реактивном периоде их концентрация снижается в 1,5 раза. По мнению авторов [Ю.С. Винник и соавт, 2014; Е.А. Томина и соавт., 2008], это может быть фактором сосудистого спазма и следствием нарушения способности поврежденных эндотелиоцитов генерировать оксид азота. В позднем реактивном периоде содержание нитритов снижается относительно как предыдущего периода, так и контроля. Затем отмечается дальнейшее низкое содержание NO. Снижение уровня инкреции NO неизбежно приводит к вазоконстрикции [Б.И. Кузник и соавт., 2014]. Доказано, что вазоспазм при криоповреждении продолжителен и сохраняется до 2–3 недель, а в последующем приводит к нарушению пролиферации в сосудистой стенке, которая является пусковым механизмом развития облитерирующего заболеваний сосудов нижних конечностей. Соответственно, концентрация активных метаболитов оксида азота достоверно снижена в позднем реактивном периоде и является важным прогностическим предиктором затяжного течения репарации при отморожениях [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].

Tom Theruvath и John Lemasters (2016) подробно изучили особенности метаболизма эндотелиальной синтазы оксида азота eNOS у пациентов с местной холодовой травмой. Авторы обнаружили, что дефицит данного фермента усугубляет реперфузию тканей форменными элементами крови, в частности лейкоцитами, способствуя повышению некроза и апоптоза, и, как следствие, нарушению микроциркуляции в поврежденных тканях. Исследования Weglinski J.P. (2015) подтверждают, что постхолодовая инфильтрация лейкоцитами поврежденных участков на фоне дефицита eNOS способствуют усилению и прогрессированию ишемии и некроза тканей.

Наряду с вазодилатирующими медиаторами, у пациентов с криоповреждением повышается уровень эндотелина-1, степень увеличения прямо пропорциональна объему альтерированных холодом тканей, площади поврежденного и активированного холодов эндотелия. Максимальные значения выявлены в позднем реактивном периоде. Между концентрацией эндотелина-1 в периферической крови пациентов и амплитудой осцилляций кровотока

эндотелиального геноза, по данным лазерной доплеровской флоуметрии, существует выявлена обратная корреляционная связь [К.Г. Шаповалов и соавт., 2010].

Процессы альтерации тканей развиваются и по мере восстановления клеточной температуры. В ходе периода холодового повреждения накапливаются продукты анаэробного метаболизма, и по мере восстановления кровотока последние поступают в кровь, провоцируя развитие реперфузионного синдрома [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; M. Dole et al., 2010]. Свободные радикалы провоцируют формирование вторичного повреждения клеточных структур. Перекисное окисление липидов является мощным драйвером повреждения всех тканей организма [К.Г. Шаповалов и соавт., 2010; М.И. Михайличенко и соавт., 2020; Ю.С. Винник и соавт., 2011]. Ферментные системы в обычных условиях инактивируют формирующиеся свободные радикалы. Эндогенные цитоантиоксиданты (неферментативная часть антиокислительной системы), включая, аскорбиновую кислоту, витамин Е, соли селена, быстро инактивируются и истощаются в момент холодной альтерации. Повреждение свободными радикалами клеточных мембран, в первую очередь стенок эндотелия сосудов, ведет к усилению агрегационной способности тромбоцитов, эритроцитов, тромбообразования с восстановлением кровотока, повышению порозности сосудистой стенки, сопровождающемуся гемоконцентрацией. Следовательно, восстановление тканевой температуры в постперфузионный период приводит к прогрессированию ишемии с клеточным аутолизом. Клетки гибнут, а в окружающих тканях очаг некроза провоцирует каскад воспаления [G. Martinez Villen et al., 2002; M. I. Khan et al., 2008; A. R. Johnson et al., 2011; C. H. Imray, 2009].

М.Ю. Юрьева и соавт. (2014) подробно изучили поздние осложнения местной холодной травмы, связанные с дисфункцией эндотелия. По их мнению, уровень эндотелиальной дисфункции достоверно отражает тяжесть отдаленных осложнений отморожения, в первую очередь, окклюзионных поражений сосудов, а значения sICAM-1, sVCAM-1, sP-selectin, изученные авторами, в группе

пострадавших в 1,5-2 раза превышают значения здоровых лиц той же возрастной группы и могут быть использованы в качестве критерия продолжительности антикоагулянтной, дезагрегантной и противовоспалительной терапии на амбулаторном этапе лечения.

М.Ю. Юрьева (2014) показала, что системная озонотерапия способствует коррекции эндотелиальной дисфункции, влияя ключевое звено патогенеза отморожений, путем снижения уровня фактора Виллебранда у пациентов, исследуемой группы. Авторы предполагают, что подобное явление способствует скорейшему купированию эндотелиальной дисфункции и более быстрой реабилитации пациентов. Полученные результаты согласуются с современными литературными данными о патогенетической роли высокого содержания фактора фон Виллебранда при местной холодовой травме.

Резюмируя выше сказанное, можно сделать вывод о ключевой роли дисфункции эндотелия в патогенезе местной холодовой травмы. Ранее проведенные работы сформировали общую схему интравазального взаимодействия клеточных структур, реализующиеся в ходе холодовой альтерации. Однако, некоторые моменты необходимо уточнить. В частности, в литературе не систематизированы данные о метаболизме молекул адгезии на поверхности клеточных мембран, нет конкретики о процессах цитодегенерации с инкрецией продуктов клеточного цитолиза. Уточнение подобных механизмов позволит шире осмыслить дисфункцию эндотелия и предположить новые схемы ранней диагностики и патогенетического лечения криотравмы.

### **1.6. Изменения уровня цитокинов при отморожениях**

Цитокины, или интерлейкины (IL), представляют собой высокоорганизованные растворимые сигнальные белки, продуцируемые многими клетками иммунной системы (нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, в-клетками и Т-клетками) для регуляции чрезвычайно большого количества

реакций [L. Velluto et al., 2014; I. Striz et al., 2011; G. Schett et al., 2013; T. W. Vasicek et al., 2013; L. Gullestad et al., 2012; D. W. Lee, 2011].

IL действуют как медиаторы и модуляторы в высоко различных средах и регулируют иммунологические реакции, развитие гемопоэза и межклеточную коммуникацию, а также ответную реакцию макроорганизма на инфекционные агенты и воспалительные стимулы [N.R. Rose, 2011]. Они взаимодействуют друг с другом сложным образом, который может быть аддитивным, синергическим или антагонистическим, или может включать индукцию одного цитокина другим. Плейотропными реакции цитокинов реализуются в их способности воздействовать на множество мишеней с провокацией физиологических эффектов. Физиологические эффекты цитокинов часто зависят от их концентраций с формированием так называемой «цитокиновой сети» [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Соответственно, комплексное изучение «цитокиновой сети» необходимо для понимания процессов при определенном характере альтерации.

Представляют несомненный интерес сведения, полученные в отношении динамики цитокинов после холодового воздействия. Эти медиаторы одновременно указывают на функциональное состояние эндотелиоцитов и активность механизмов воспаления в тканях. Содержание в крови пострадавших с отморожениями в дореактивном периоде травмы IL-18, IL-4 и TNF $\alpha$  указывает на «отключение» периферии от общего кровотока, характерного для данного периода отморожений. Повышение концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 отражало общую реакцию организма на появление очага альтерации и тотального сосудистого спазма. Возрастание значений IL-1 $\beta$  и IL-8 в артериальной крови поврежденной конечности относительно венозной подтверждало такой вывод. При низкой температуре до этапа согревания метаболические процессы находились на минимальном уровне, что тормозило местную продукцию цитокинов [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].



В раннем реактивном периоде криотравмы наблюдалось максимальное возрастание содержания провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов. Также имеются сведения, что в эти же сроки с момента травмы наблюдался лейкоцитоз, повышение концентрации острофазных белков, активация систем свертывания крови и фибринолиза, клинические признаки системной реакции организма на воспаление [Ю.С. Винник и соавт., 2011; Н.Н. Петрищев и соавт., 2003; M. Mudau et al., 2012].

Значительное повышение содержания в крови пострадавших IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-8 именно в данном периоде травмы объясняется появлением протяженной зоны поврежденного и активированного холодом эндотелия, а также активным поступлением интерлейкинов в системный кровоток из поврежденных тканей после купирования спазма. При этом последние способны проявлять в ряде случаев не только местные, но и системные эффекты [Б.И. Кузник и соавт., 2014; С.А. Сумин и соавт., 2017].

Содержание IL-8 также могло возрасти под влиянием тромбина и тканевого активатора плазминогена. Содержание в крови IL-18 увеличивалось в наименьшей степени, так как он не продуцируется эндотелием, а при отморожениях зона повреждения тканей ограничена по сравнению с ожоговой и механической травмой. Соответственно, повышение уровня цитокинов при холодовом повреждении не достигало значений, регистрируемых при обширных термических ожогах. Обращает на себя внимание преобладание содержания провоспалительных интерлейкинов в венозном русле пораженного сегмента, а противовоспалительного – в крови интактной конечности. Полученные результаты подтверждали особое значение альтерации эндотелия в индукции воспалительной реакции и механизмах изменений защитных систем при местной холодной травме [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].

Возрастание уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при отморожениях, несомненно, сопровождалось реализацией их многочисленных функций. В частности, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  усиливали экспрессию

ICAM-1 и VCAM-1, повышали активность индуцибельной синтазы NO в лейкоцитах, тромбоцитах и гепатоцитах. Более того, IL-1 $\beta$  способен повышать концентрацию L-аргинина в клетках-продуцентах NO [Л.В. Васина и соавт., 2014; М.И. Михайличенко и соавт., 2020].

Важным звеном по установлению роли цитокинов при местной холодовой альтерации явилась оценка их регенераторных и хемоаттрактантных свойств. Не выявлено зависимости между тяжестью отморожений и уровнем TGF $\alpha$ . При увеличении объема пораженных холодом тканей в крови пострадавших уменьшалась концентрация TGF $\beta$ 1, одновременно возрастало содержание VEGF. Обратная зависимость уровня TGF $\beta$ 1 от объема поврежденных холодом тканей объясняется противовоспалительной направленностью реализации его эффекта [С.А. Сумин и соавт., 2017; Б.И. Кузник и соавт., 2014]. Возможно также, что при усугублении тяжести травмы угнетались рост фибробластов и синтез коллагена, в контроле над которыми участвует TGF $\beta$ 1. Кроме того, некоторые исследованные цитокины, уровень которых существенно возрастал, являлись антагонистами TGF $\beta$ 1 (в частности, IL-4, угнетающий экспрессию TGF $\beta$  в эозинофилах) [L. Velluto et al., 2014; I. Striz et al., 2011].

Ввиду того, что VEGF является высокоспецифичным предиктором дисфункции эндотелия, прямая зависимость его концентрации от объема пораженных холодом тканей указывала на особое значение инкреции эндотелия в патогенезе криоповреждения и их влияние на характер течения раневого процесса при отморожениях [M. Ekdahl et al., 2018; M. Mudau et al., 2012]. Известно, что сосудистый фактор роста (VEGF) является одним из основных маркеров эндотелия, отражающих его функциональную составляющую [Б.И. Кузник и соавт., 2018]. Анализ метаболизма VEGF указал на то, что у больных в раннем реактивном периоде криотравмы его концентрация не превышала контрольные показатели [Ю.С. Винник и соавт., 2014; К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Авторы полагают, что в течение 2-х суток с момента восстановления температуры индукция ангиогенеза не осуществляется. Дисфункция эндотелия после холодовой альтерации может сопровождаться угнетением синтеза и инкреции

исследуемого маркера. В позднем реактивном периоде криповреждения выявлено повышение VEGF. Возрастание концентрации последнего в системном кровотоке указывает на пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток. Следовательно, у пациентов с глубокими отморожениями выявлена высокая пролиферативная активность эндотелиальной выстилки сосудов, а процессы гранулирования и рубцевания сопровождаются ангиогенезом [Чигунадзе Л.А., 2016; Винник Ю.С. и соавт., 2014; К.Г. Шаповалов и соавт., 2010].

Viem et al. (2003) акцентировали большое значение влиянию рецепторного антагониста (VGA1155) фактора роста эндотелия (VEGF) на течение и исходы местной холодовой травмы. Как известно, сосудистый эндотелиальный фактор роста является основным медиатором ангиогенеза и фактором, провоцирующим повышенную проницаемость сосудов. Блокада рецепторов VEGF может иметь определенный потенциал для лечения и прогнозирования МХТ. Авторы продемонстрировали, что антагонист VEGF ослабил проницаемость сосудов и уменьшил посттравматический отек тканей у крыс с местной холодовой травмой в эксперименте. Подобное терапевтическое явление предполагает уменьшение зоны некроза и паранекроза у пострадавших, что, вне всякого сомнения, оказывает благоприятное действие на период заживления и реабилитации при отморожениях. Таким образом, антагонисты VEGF рецептора могут стать новой терапевтической эрой, по мнению авторов, как в лечении местной холодовой травмы, так и последствий других повреждений [Чигунадзе Л.А., 2016; К.Г. Шаповалов и соавт., 2010; Ю.С. Винник и соавт., 2011; Л.В. Васина и соавт., 2017].

Гиперсекреция цитокинов провоцирует своеобразный «ожог» эндотелиальной выстилки с провокацией дисфункции эндотелия, которая подробная изучается у пациентов с криотравмой. Изучение новых составляющих «цитокиновой сети» позволит глубже и подробнее понять биомеханизм реализации межклеточных контактов у пациентов с отморожениями.

### 1.7. Изменения системы гемостаза при отморожениях

Повышенный агрегационный потенциал тромбоцитов и увеличение содержания в крови фактора фон Виллебранда являются маркерами нарастающей «микроциркуляторной» эндотелиальной дисфункции, которая, вне всякого сомнения, может переходить в системную. Как известно, фактор фон Виллебранда является мощным активатором тромбоцитарных гликопротеиновых рецепторов (GpI), через которые запускается каскад тромбоцитарного гемостаза с последующим тромбозом микроциркуляторного русла [Б.И. Кузник и соавт., 2014, М.И. Михайличенко и соавт., 2020].

Одним из основных маркеров дисфункции эндотелия является фактор фон Виллебранда (vWF) [Е.А. Томина и соавт., 2008; В.К. Гостищев, 2009]. Известно, что данный маркер является крупным многомерным гликопротеином, 85% которого инкретируется эндотелиоцитами, а 15% - мегакариоцитами и кровяными пластинками. Фактор фон Виллебранда, инкретируемый эндотелиоцитами поступает в плазму и концентрируется внутри эндотелиоцитов в тельцах Weibel-Palade, откуда инкретируется после стимуляции и дегрануляции последних. Инициаторами дегрануляции выступают факторы гемостаза и воспаления. Одной из функций фактора фон Виллебранда является реализация процессов адгезии кровяных пластинок в области повреждения эндотелия [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003].

Установлено, что у пациентов с криотравмой выявлено повышение коллагенсвязывающей активности фактора Виллебранда. В раннем реактивном периоде регистрируется значительное повышение концентрации выявленного маркера, однако пик коллагенсвязывающей активности приходился на поздний реактивный период [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; Б.И. Кузник и соавт., 2014].

Одновременно при изучении активности vWF у пациентов с криотравмой нижних конечностей Михайличенко М.И. (2009) установил, что в раннем реактивном периоде этот показатель также возрастал более чем в 2 раза по сравнению с нормой; в позднем реактивном периоде по сравнению с предыдущим

не отличался статистической значимостью. Реализация процессов адгезии и агрегации кровяных пластинок сопровождалась максимальным повышением данного показателя. В периоде гранулирования и эпителизации коллагенсвязывающая активность фактора vWF снижалась, все же превышая контрольный уровень. Увеличение объема альтерированных холодом тканей сопровождалось увеличением концентрации уровня исследуемого маркера.

Параллельно с активацией гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов и эндотелиоцитов происходит снижение концентрации оксида азота, который является мощным эндотелиальным фактором вазодилатации, и повышения уровня эндотелина-1, важнейшего вазоконстриктора. Снижение NO связано с повреждением и снижением функции эндотелия, повышение эндотелина-1 – следствие вовлечения в процессы активации новых порций активированных тромбоцитов [Е.А. Томина и соавт., 2008, Ю.С Винник и соавт., 2011].

При криповреждении выявлено и возрастание продукции других эндотелий-зависимых факторов гемостаза: тканевого активатора плазминогена (t-РА) и ингибитора активатора плазминогена (РАI-1). Максимальная концентрация t-РА в плазме зафиксирована в раннем реактивном, а РАI-1 – в позднем реактивном периоде. В венозной крови, оттекающей от поврежденной холодом конечности, концентрация t-РА в 1,5 раза выше, чем в оттекающей от здоровой, РАI-1 – в 1,2 раза выше. Динамика вышеперечисленных биомаркеров эндотелиальной дисфункции зависит от периода холодовой травмы, степени ее тяжести [К.Г. Шаповалов и соавт., 2019, В.А. Коннов и соавт., 2014].

Оценены изменения сосудисто-тромбоцитарного и плазменно-коагуляционного гемостаза у больных с местной холодовой травмой конечностей III-IV степени с исходной недостаточностью питания, которая оказалась весьма распространенной у пациентов данной группы. Установлено уменьшение количества тромбоцитов в раннем реактивном периоде у больных с отморожениями конечностей III-IV степени в обеих группах, независимо от характера нутритивного статуса. В то же время, у больных в группе с недостаточностью питания кровяных пластинок меньше, чем у больных с

эйтрофией. Повышение уровня ингибитора тканевого фактора обнаружено только в группе с нормальным нутритивным статусом. При отсутствии разницы по отношению к контролю в группе с недостаточностью питания установлено уменьшение уровня TFPI. В группе больных с нутритивной недостаточностью выявлено уменьшение уровня АТ III. В свою очередь, содержание АТ III в крови больных с нормальным и стабильным статусом меньше, чем у здоровых людей. У больных с недостаточностью питания депо глутамина, незаменимой в условиях стресса аминокислоты, истощается, в связи с исходным снижением объёма мышечной ткани. В группе пострадавших с недостаточностью питания установлено уменьшение показателя t-РА как относительно контроля, так и в сравнении с 1-й группой. В этой же группе не обнаружено различия с контролем по содержанию в плазме PAI-1, но выявлено уменьшение данного показателя по отношению к больным 1-й группы. Увеличение в плазме крови PAI-1 не так значительно, как t-РА, который свидетельствует об активизации процессов фибринолиза. Вероятно, недостаточность питания у больных с местной холодовой травмой повлияла и на синтез ингибитора тканевого активатора плазминогена, и при значительно меньшем, чем у пациентов без трофического дефицита количестве t-РА, развитие фибринолиза не пострадало. Таким образом, авторы показали, что при исходной недостаточности питания у пострадавших с отморожениями конечностей III-IV степени регистрируются выраженные изменения показателей системы гемостаза [В.А. Коннов, 2015; К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].

Следовательно, сбой сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов провоцируют ремоделирование и микрокровотока в очаге альтерации, который в свою очередь, создает фундамент для повторной активации систем гемостаза. Замыкается порочный круг. При этом до сих пор не изучен метаболизм молекул адгезии в разные периоды криотравмы, в литературе также не приводятся данные о цитодегенеративных процессах при отморожениях, в частности экскреции металлопротеиназ и ассиметричного диметиларгинина. Роль

этих биологически активных веществ описана при неблагоприятном течении многих внутрисосудистых патологий.

### **1.8. Влияние нарушений микрокровотока на течение и исходы комплексного лечения отморожений**

Состояние микроциркуляторного русла давно считается определяющим фактором в патогенезе холодовой травмы конечностей [К.Г. Шаповалов, 2019]. При наличии преморбидной патологии кровообращения и иннервации (нейроваскулит, облитерирующие заболевания сосудов, сахарный диабет, травмы и пр.) наблюдается затяжное течение раневого процесса, более высокий уровень некрэктомий. Холодовая травма часто приводит к непосредственному повреждению сосудов и нервов, а также к нарушениям регуляции артериовенозного русла. В свою очередь, отморожения являются фактором, способствующим развитию такой патологии, как облитерирующий эндартериит, нейроваскулит, костно-мышечная дистрофия [Н.И. Троицкая, 2013; A. I. Dempsey et al., 2018; K. Jussila et al., 2014].

К.Г. Шаповалов и соавт. (2009) выявили изменения в микроциркуляторном русле у больных с местной холодовой травмой. Исследовались показатель микроциркуляции, нейрогенный и миогенный тонус, также максимальные амплитуды колебаний эндотелиального, нейрогенного, миогенного, дыхательного и пульсового диапазонов. Авторами установлено, что динамика показателей микрокровотока и сосудистого тонуса у больных с отморожениями нижних конечностей зависела от периода местной холодовой травмы. В дореактивном периоде регистрировались признаки тотального спазма сосудов. В раннем реактивном периоде отморожений увеличивался приток крови из артериального русла, возрастала активность эндотелиальных факторов релаксации. При дальнейшем течение раневого процесса преобладало повышение миогенного и нейрогенного компонентов сосудистого тонуса, уменьшался артериальный и нутритивный кровоток.

Выявленные изменения согласуются с ранее выдвинутой теорией криобиологов, в которой указано, что при местном охлаждении преобладают сосудистые реакции в зоне поражения. Отмечается особая роль в патогенезе отморожений спазма сосудов и ишемии, гибель ткани при холодовой травме происходит вследствие расстройства кровообращения, некроз в подавляющем большинстве случаев в тканях представляется вторичным [С. D. Leonard et al., 2016]. При этом указано, что в первую очередь страдают высокодифференцированные в анатомическом и функциональном отношении ткани, которые особенно чувствительны к гипоксии, в частности – эндотелий.

Показано, что изменения компонентов тонуса сосудов и параметров микроциркуляции при местной холодовой травме нижних конечностей являются факторами, которые приводят к неблагоприятному течению раневого процесса. Многим пациентам приходится выполнять повторные некрэктомии и ампутации, причем приживление кожных трансплантатов гораздо хуже относительно ожоговой травмы. Нередко течение раневого процесса при отморожениях осложняется сепсисом, тромбозами. Среди отдаленных последствий холодовых альтераций выделяют хронические заболевания сосудов конечностей, нарушения иннервации, костно- и миодистрофические процессы. Предикторами и пусковыми элементами при этом, очевидно, также являются нарушения микроциркуляции и тонуса сосудов [K. Jussila et al., 2014; E. M. Vinclesio et al., 2020; D. Gavhed et al., 2003].

Соответственно, с учетом современных учений об эндотелии как нейроэндокринном органе, контролирующем свойства тонуса, атромбогенности и резистентности сосудов посредством инкреции и куммуляции биомедиаторов, вышеописанные сведения о динамике маркеров дисфункции эндотелия при криоповреждении позволяют интерпретировать изменения его функционального статуса в качестве одного из основных и наиболее ранних звеньев патогенеза многих заболеваний.

Перспективы улучшения результатов комплексного лечения криоповреждения связаны с последующим изучением механизмов нарушения целостности и



функции эндотелиальных клеток, с поиском новых способов инструментальной диагностики последствий криоповреждения, с определением эффективных прогностических биомаркеров и таргетной патогенетически целесообразной лекарственной терапии, оптимизации хирургических подходов и комплексного лечения криотравмы.

### **1.9. Раннее прогнозирование осложнений криоповреждения**

Проблема прогноза течения холодовой травмы является одной из самых актуальных в современной термической травме. Частота осложнений при местной холодовой травме варьирует от 23,5 до 35% [М.И. Михайличенко, 2019]. При сопутствующей патологии кровообращения и иннервации (нейроваскулит, облитерирующие заболевания сосудов, сахарный диабет, травмы и т.д.) объём поражения, а также длительность течения раневого процесса увеличиваются [К.Г. Шаповалов, 2019]. На первое место в структуре осложнений выходит нагноение мягких тканей и несостоятельность культи после оперативного лечения, а также холодовой нейроваскулит с трофическими нарушениями дистальных сегментов конечностей. На ранних сроках травмы не всегда удается определить точную зону демаркации, поэтому прогноз, как правило, не ясен. Ранний прогноз позволяет выполнить коррекцию лечения, что способствует предотвращению развития послеоперационных осложнений.

Исторически сложилось так, что агрессивное раннее хирургическое вмешательство и его попытки считаются угрозой потенциально жизнеспособным тканям и, таким образом, увеличивают уровень ампутации. Сравнительно недавно предложен способ радиологической оценки жизнеспособности тканей. Некоторые авторы этого способа ранней диагностики выступали за более агрессивный подход к радикальному лечению криотравмы с появлением технециевой МРТ-сцинтиграфии [В. Marsigny et al., 2000] Предварительные результаты показывали, что улучшение визуализации поврежденных тканей может сократить продолжительность пребывания в стационаре и позволяет сохранять

максимальную длину культи [В. Marsigny et al., 2000]. Однако, данный способ не позволил в полной мере оценить жизнеспособность костной и нервной ткани, ввиду чего у пациентов с агрессивным оперативным лечением наметились множественные осложнения в виде остеомиелитов и расстройств иннервации пораженного сегмента.

Современный подход к лечению отморожений изменился от сугубо консервативного подхода к современным методам ранней диагностики уровня криповреждения с максимально быстрым началом фибринолитической терапии [А. Lindford et al., 2017; А. Е. Ibrahim et al., 2014]. В частности, недавно предложен "балл Хеннепина" [R. M. Nygaard et al., 2014] Медицинского центра Миннеаполиса (США). Недавно опубликованная оценка Хеннепина является полезным инструментом для оценки глубины повреждения при местной ходовой травме. Суть способа основана на фракционированном введении небольших фибринолитиков в артерию пораженного сегмента с постоянным мониторингом жизнеспособности костной ткани с помощью описанной выше технеционной МРТ-сцинтиграфии [В. Marsigny et al., 2000].

Koshi E.N. et al. (2001) большое значение придавали более простому способу ранней диагностики уровня криповреждения, а именно – способу ультразвуковой доплерографии пораженного сегмента. Авторы придавали большое значение тканевой перфузии и уточнению уровня ишемизации тканей. В исследованиях говорится об уровне отсутствия перфузии на уровне межфалангового сочленения, либо более проксимально. Увеличение зоны ишемии проксимальнее основной фаланги указывает на неблагоприятный прогноз криотравмы и высокий уровень повреждения. Авторы выделили 4-х балльную систему местной криотравмы конечностей.

Gongaza E. A. et al. (2008) и описал макроскопически неблагоприятные прогностические признаки, появляющиеся в раннем реактивном периоде. К ним исследователи отнесли «холодную кожу, онемение, синюшные пальцы без пузырей и наличие «проксимальных» пузырей с геморрагической жидкостью. По

мнению авторов, наличие выше перечисленных признаков является предикторов высоких ампутаций конечностей и требует срочной фибринолитической терапии.

Известен способ оценки степени локальной криттравмы в раннем реактивном периоде [Ю.С. Винник и соавт, 2014], который основывается на том, что выделяют лимфоциты периферической крови, оценивают выраженность повреждения плазматической мембраны лимфоцитов в состоянии блеббинга с помощью фазово-контрастной микроскопии из расчета на 100 клеток, определяют уровень аспартатаминотрансферазы, вычисляют индекс блеббинга лимфоцитов

$$\text{ИБЛ} = \frac{\text{терминальный блеббинг} \times 100}{\text{начальный} + \text{терминальный блеббинг}} (\%)$$

(ИБЛ) по формуле:

умножают на уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ) и получают коэффициент степени отморожения (КСО). При значениях КСО от 3,96 до 7,7 усл. ед. диагностируют II степень локальной холодовой травмы, от 7,7 до 17,4 усл. ед. - III степень, более 17,4 усл. ед. - IV степень.

Существует способ прогнозирования течения раневого процесса при глубоких отморожениях нижних конечностей [21], который основывается на исследовании кровотока в пораженной конечности с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. Регистрируют показатели гемодинамики. Рассчитывают коэффициент К по формуле:  $K = (\text{ПМ} \times \text{Ас}) / (\text{НТ} \times \text{МТ})$ , где ПМ - показатель микроциркуляции, Ас - максимальная амплитуда пульсовых колебаний, НТ - показатель нейрогенного тонуса, МТ - показатель миогенного тонуса. При значении К менее 0,03 прогнозируют неблагоприятное течение раневого процесса в виде развития гнойно-септических осложнений.

Применяется способ раннего прогнозирования формирования глубоких некрозов при тяжелых отморожениях верхней конечности [23], который основывается на регистрации разности кожной температуры в точках пораженного сегмента кисти. При этом, если в течение первых суток после получения холодовой травмы между любыми соседними точками в пределах одного луча кисти выявляют отрицательный температурный градиент,

направленный дистально и превышающий 6 °С, и при этом температура в точке, в сторону которой направлен температурный градиент, не превышает температуру окружающей среды, прогнозируют высокую вероятность формирования некроза луча кисти с линией демаркации между точками, между которыми выявлен указанный градиент.

Однако, необходимо указать, что все выше перечисленные способы имеют свои недостатки, в частности: недостаточная точность ввиду наличия преморбидной патологии, сложность выполнения, отсутствие в стационаре необходимого оборудования.

Несмотря на существенный вклад современных научных достижений в понимание патогенеза отморожений, многие аспекты остались неизученными. В современной научной литературе нет данных о периферической нейропатии и ее предикторах при отморожениях; не в полном объеме изучены особенности межклеточных взаимодействий и механизмов, ведущих к этим процессам; нет данных о ремоделировании коллагеновых волокон и возможных механизмах репарации.

Следовательно, перспективным и актуальным является поиск новейших простых и эффективных этиопатогенетически обоснованных вариаций максимально быстрой верификации глубины поражения и последствий криоповреждения, которые, вне всякого сомнения, отразятся на подходах к хирургическому лечению местной криотравмы.

### **1.10. Комплексное лечение отморожений**

Терапия холодовой травмы окружено спорами и неоднозначными мнениями ученых. Общепринятыми являются только несколько принципов. Лечение местной холодовой травмы можно разделить на три фазы:

- фаза до согревания тканей (дорективный период),
- фаза согревания (ранний реактивный период),
- фаза последствий и вторичной альтерации.

В первую фазу важнейшим моментом является предотвращение быстрого оттаивания тканей и максимальная защита пораженного сегмента от экзогенных механических воздействий. Устаревшие принципы «растирание» пораженных тканей снегом, когда-то являвшиеся основой лечения, не усиливают местный кровоток (как и предполагалось), а провоцируют нежелательные механические травмы [S. A. Morrison et al., 2015; L. Norrbrand et al., 2020; L. R. Folio et al., 2007]. На этапе медицинской эвакуации пораженная конечность изолируется теплосберегающими повязками.

Во вторую фазу местной холодовой травмы лечение претерпевало значительные изменения. Во времена Второй мировой войны широко применялось быстрое согревание тканей. Предполагалось, что применение внешнего тепла к пострадавшей от холода части увеличит потребность ткани в кислороде и ускорит ее метаболизм, что будет способствовать уменьшению зоны некроза [R. P. Craig et al., 2007]. Исследования Фурмана и Кримсона и позже Финнерана и Шумакера показали, что это не так. Энтин и Бакстер, казалось, решили проблему в контролируемой серии экспериментов, указывающие на то, что идеальная температура согревания конечности должна быть температура + 40°C [160]. Однако современные взгляды на лечение отморожений, основанные на работах Hutchison (2019), указывают на соблюдение более узкого температурного диапазона с обязательной интенсивной реанимационной консервативной терапией.

Долганова Т.И., и соавт. в 2017 году предложили выявить доклиническую степень ишемии: нарушения в реактивности сосудов прекапиллярного звена. Помимо этого, на основе данного исследования авторы применили новый способ ведения пострадавших с отдаленными последствиями отморожения. Суть его заключается в чрескостном дистракционном остеосинтезе по Илизарову. Авторы считают, что медикаментозное лечение, направленное на уменьшение вазоконстрикции сосудов, у пациентов с последствиями холодовой травмы в процессе тракционного воздействия аппаратом Илизарова дает невыраженный эффект, т.к. резервные возможности микроциркуляторного русла уже

максимально реализованы методом чрескостного остеосинтеза. Целесообразно проведение превентивной ангиогенной и нейротрофической терапии, которую следует проводить уже в преддистракционном периоде.

В фазу последствий современные ученые-клиницисты особую роль отводят вторичной ишемии поврежденного сегмента. В работах Masters et al. (2018) по патофизиологии прогрессирующей дермальной ишемии озвучен протокол неотложной помощи при отморожении в фазе согревания и оттаивания, который указывает на необходимость ингибирования воспалительных процессов, описанные ранее. Этот протокол представляет собой одну из немногих опубликованных попыток обосновать терапевтическую стратегию современными знаниями патофизиологии.

Основные терапевтические мероприятия при местной холодовой травме направлены на предотвращение и уменьшение прогрессирования ишемии пораженного участка [M. Ströhle et al., 2018; M. Heisig et al., 2015; C. A. Lansdorp et al., 2017; A. I. Dempsey, 2018; N. R. Desai, 2019; M. Candela et al., 2001]. Доказательная база о необходимости назначения антикоагулянтов, дезагрегантов и обезболивающих препаратов собрана в достаточном объеме и имеет хороший клинический эффект [M. Heisig et al., 2015; C. Handford et al., 2014; I. Harirchi et al., 2005; J. V. Murphy et al., 2000]. Широкое распространение получила и гипербарическая оксигенация крови [B. Higdon et al., 2015; D. Von Heimburg et al., 2001; A. Rousseau et al., 2007]. Однако, особая роль на современном этапе отводится тромболитической терапии при отморожениях.

Изученная подробно реперфузионная травма возникает, когда кровоток восстанавливается. При оттаивании происходит дальнейшее повреждение эндотелия и лизис клеток, высвобождение воспалительных цитокинов и дальнейшее развитие микрососудистого тромбоза и отека [К. Г. Шаповалов, 2019]. Доказано, что ранняя тромболитическая терапия может ограничивает микрососудистый тромбоз и предотвращает реперфузионное повреждение.

Существует несколько исследований, описывающих тромболитическую терапию у людей. Описаны два метода – катетерно-направленная

внутриартериальная и системная внутривенная терапия. Никаких проспективных рандомизированных исследований, сравнивающих эти два метода, не проводилось.

Bruen K.J. et al, и соавт. опубликовал в 2007 году ретроспективный обзор пациентов своего учреждения, получавших фибринолитическую терапию при тяжелом отморожении. Они сравнили пациентов, получавших фибринолитики, начиная с 2001 года, с историческими контрольными показателями пациентов стандартной терапии, а также с другими пострадавшими, получавшими терапию фибринолитиками позднее, чем через 24 часа после травмы. Авторы сообщили, что высокие ампутации удалось снизить до 10%, при наличии высоких ампутаций у 41% со стандартной терапией.

В 2005 году Twomey E.F. et al. опубликовано нерандомизированное проспективное исследование для оценки безопасности и эффективности фибринолитиков при тяжелом отморожении. Исследование продолжалось 14 лет (1989 - 2003 год). Исследование показало безопасность и эффективность фибринолитической терапии у большинства пациентов с местной холодовой травмой. Авторы указывают на значительное снижение числа ампутаций и уменьшение поздних постальтерационных осложнений.

Противопоказания к применению фибринолитиков в исследовании Bruen K.J. включали поверхностное отморожение, вовлечение кончиков дистальных фаланг, сопутствующую травму, неврологические нарушения, недавнюю операцию с риском кровотечения. Противопоказания к применению фибринолитиков в исследовании Twomey E.F. включали: тяжелую артериальную гипертензию, недавнюю травму, инсульт или нарушение свертываемости крови, беременность, умственную отсталость, наркотическую или алкогольную интоксикацию.

Несмотря на успехи консервативной терапии, вопросы хирургического лечения отморожений остаются открытыми и требуют дальнейшего уточнения, изучения и обсуждения. В современной литературе практически нет работ, посвященных оперативному лечению при отморожениях.

В частности, нет однозначного мнения, касающегося тактики в условиях пузырей и содержащегося в них экссудата. Доказан высокий уровень содержания в жидкости пузырей простагландина и тромбоксана А<sub>2</sub> [В.А. Иванов и соавт., 2008]. Авторами исследования вынесено предложение о необходимости удаления патологического содержимого. По мнению других ученых, пузыри представляют собой структурные повреждения поверхностных слоев кожи, и нарушение целостности последних приведет к худшим результатам [Ю.С. Винник и соавт., 2011]. Это противоречие, несомненно, является результатом явного отсутствия практических и клинических данных, а также каких-либо рекомендаций по данной тематике.

Немецкий хирург Dobnikar et al. в 2009 году озвучил неоспоримый постулат оперативного лечения местной холодовой травмы: «отморожение в январе, ампутация в июле». Действительно, радикальные операции применяются только в качестве поздних пособий при местной холодовой травме. Некротомия и фасциотомия показаны и на ранней стадии, но только в случае выраженного дефицита кровообращения или компартмент-синдрома [А.В. Шуткин, 2014; J. V. Murphy et al., 2000; D. Millet et al., 2016]. Причем необходимо указать на частую неэффективность проводимых мероприятий ввиду прогрессирования отека с провокацией нарастающей ишемии и некрозом перифокальных тканей.

Особую роль играют и ранние осложнения со стороны раневой поверхности при местной холодовой травме. В частности – наличие анаэробной клостридиальной инфекции. Случаи газовой гангрены описаны в современной литературе и требуют агрессивных хирургических мероприятий [С. Muetterties et al., 2018; В.А. Сизоненко, 2003]. Как известно, течение этого грозного осложнения невозможно контролировать с помощью обычных антибиотиков. Активная терапевтическая и хирургическая тактика позволяет предотвратить развитие газовой гангрены конечности [А.В. Шуткин, 2014].

Доказано, что мумификация конечности происходит в течение от 1 до 3 месяцев. И только на этом этапе можно принять решение об ампутации



конечности или ее сегмента ввиду формирования демаркационной линии [С. Handford et al., 2017; Т. М. Ikäheimo et al., 2011; С. Imray et al., 2009].

Подробно изучена регионарная симпатэктомия при отморожения. Современная литература содержит неоднозначные данные по этой теме. Существуют мнения поддержки и дискредитации этого способа оперативного лечения местной холодовой травмы [Шаповалов К.Г. и соавт, 2008; Р. L. Gildenberg et al., 1964]. Экспериментальные данные показывают, что симпатэктомия, выполненная в течение первых нескольких часов после травмы, увеличивает отек и ускоряет разрушение тканей. В случае, если симпатэктомия откладывается до 24-48 часов после согревания, наблюдается более быстрое разрешение отека и уменьшение зоны паранекроза [Р. L. Gildenberg et al., 1964]. В связи с этим оптимальные сроки симпатэктомии останутся неясными и по сей день.

Таким образом, в настоящее время не существует четких сроков и этиопатогенетически обоснованных показаний к лечению отморожений. Выжидательная тактика, регламентированная в национальных клинических рекомендациях, с одной стороны обоснована, с другой – создает предпосылки для формирования осложнений и значительно удлиняет сроки стационарного лечения криоповреждения. Наличие и пугающий процент поздних осложнений заставляет усомниться в целесообразности применяемой тактики и требует разработки новых способов ранней диагностики как глубины поражения, так и новых способов хирургического лечения холодовой травмы.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

### 2.1. Характеристика клинической группы

Проведено одноцентровое проспективное открытое нерандомизированное контролируемое сравнительное интервенционное исследование.

В исследование включены 213 больных с III и IV степенью тяжести (Рисунок 1) и в разные периоды местной холодовой травмы: в позднем реактивном периоде (5 сутки), который соответствует дооперационному периоду; а также в периоде гранулирования и эпителизации (30 сутки), который соответствует послеоперационному периоду. Уровень пораженных низкими температурами тканей также отличался. Из числа включенных в исследование пациентов сформировано три группы в зависимости от массива пораженных холодом тканей: 1 группа – поражение на уровне пальцев, 2 группа – поражение на уровне плюсны, 3 группа – поражение более проксимальных сегментов конечностей, всей стопы или дистального сегмента голени. Распределение пациентов относительно массива тканей и периодов клинического сравнения приведено в Таблице 1.

**Таблица 1** - Уровень поражения сегментов конечностей и периоды клинического сравнения пациентов с отморожениями

Уровень	Количество пациентов	%
Пальцы стоп	71	33,4
Плюсны	73	34
Голени	69	32,6
Дооперационный период (5 сутки)	93	49
Послеоперационный период (30 сутки)	95	51

При работе с пострадавшими соблюдались все необходимые принципы, регламентированные статьей 24 Конституции РФ и Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964). Пациенты госпитализировались в Краевой центр термической травмы ГУЗ «Городской клинической больницы» г. Читы в период с 2018 по 2020 гг.



**Рисунок 1** - Местная холодовая травма нижних конечностей III - IV степени

Научное исследование рассмотрено и одобрено решением этического комитета ФГБОУ ВО ЧГМА МЗ РФ № 92 от 29 октября 2018 года. Объект исследования: здоровые добровольцы, пациенты с отморожениями и их кровь (Рисунок 1).

Возраст больных варьировал в пределах от 25 до 45 лет. Исследуемая группа формировалась в основном из лиц мужского пола. Контрольная группа

сформирована из 50 относительно здоровых доноров аналогичной возрастной категории.

**Таблица 2** - Распределение больных по возрасту

Возраст	Больные	%
25-30	40	19
30-35	57	27
35-40	75	35
40-45	41	19

Критерии исключения: наличие окклюзирующих заболеваний артерий, варикозного расширения вен, гипертонической болезни, бронхиальной астмы, сахарного диабета, воспалительных процессов иного генеза полипатий.

Альтерация низкими температурами, приводящая к возникновению локальной холодовой травмы III-IV степени, отмечалась в условиях Забайкалья с конца ноября по март месяц. У пациентов с глубокими отморожениями наблюдались участки и поверхностного поражения кожи I-II степени.

Распределение пострадавших по периодам в момент госпитализации приведено в Таблице 3.

**Таблица 3** - Периоды местной холодовой травмы при поступлении пострадавших в стационар

Период	Количество	%
Поздний реактивный период	118	55
Период гранулирования и эпителизации	95	45

В большинстве случаев всех госпитализаций пациентов с криотравмой регистрировалось поражение обеих нижних конечностей (95-97%), а именно, их дистальных отделов. Дифференцировка сегментов пораженных конечностей приведена в Таблице 4.

Из приведенных данных следует, что изолированное повреждение холодом одной конечности наблюдалось редко. Преобладали симметричные поражения.

**Таблица 4 - Локализация криотравмы III-IV степени**

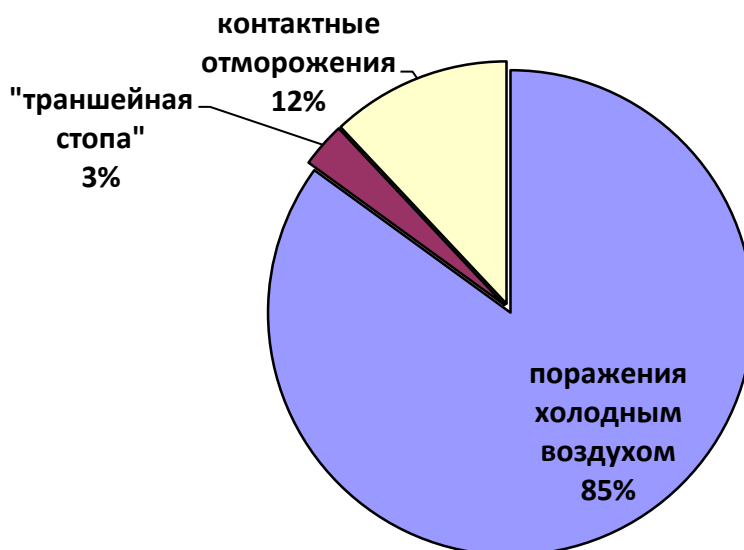
Сегмент конечности	Количес тво	%
Дистальный сегмент (правая нижняя конечность)	22	10,4
Дистальный сегмент (левая нижняя конечность)	41	19,6
Симметричные поражения	150	70

Согласно органосберегающей тактике большая часть операций производилось в период гранулирования и эпителизации (24 сутки с момента криотравмы). При повреждении IV степени пальцев и крупных суставов проводились некрэктомии, при протяженном некрозе стоп выполнялись ампутации по демаркационной линии. При глубокой альтерации пальцев проводились экзартикуляции пораженных сегментов. При демаркации на уровне более крупных суставов – аутодермопластика и некрэктомии.

Согласно с общепринятыми стандартами пострадавшим с криотравмой назначалась антикоагулянтная, антиагрегантная терапия, антибактериальная терапия и местное лечение. Показанием к оперативному лечению принято считать гангрену пораженного сегмента конечности с обязательным наличием демаркационной линии, концевой некроз ранее сформированной культы, нагноение послеоперационной раны и инструментально подтвержденный посттравматический остеомиелит.

Для анализа повторных операций у пациентов в поздние сроки отморожений выделено две группы пациентов: контрольная группа (n=40) пострадавших с назначенной стандартной терапией, и пациенты с применением методов прогнозирования осложнений и коррекцией проводимой терапии при выявлении риска неблагоприятного течения (n=60).

Среди видов отморожений наиболее часто встречались сверхострая и острая травмы в виде поражения холодным воздухом. Однако встречались и подострые формы, такие как траншейная стопа, а также контактные криповреждения. Данные о распределении больных в зависимости от форм местной холодовой травмы приведены на Рисунке 2.



**Рисунок 2** - Распределение больных в зависимости от форм отморожений

Известно, что течение отморожений иногда осложняется анаэробной инфекцией. За период наблюдения нами не регистрировалось таких явлений. У некоторых пострадавших отмечалось развитие флегмоны, гнойных затеков, сопровождавшихся лимфангоитом, лимфаденитом, а в тяжелых случаях - сепсисом. Ввиду того, что при этом течение патологии сопровождалось выраженной воспалительной реакцией, изменением состояния систем микроциркуляции, гемостаза, иммунитета – такие больные исключались из исследования.

## **2.2. Методики исследования**

### **Метод исследования микроциркуляторного русла**

Метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) (Laser Doppler Perfusion) - реализован на использовании лазерного излучения с определенной длиной

излучаемой волны. Контактируя с исследуемыми тканями отраженный импульс генерируется в виде двух составляющих: постоянной и переменной(временной). Постоянный сигнал отражается от стабильных субстанций исследуемой зоны, переменный(временный) сигнал реализован движущимися структурами, в частности – форменными элементами крови. Отраженный импульс регистрируется с формированием доплеровского сдвига частоты, пропорционального суммарной скорости движения форменных элементов в исследуемой зоне (Дремин В.В., Крупаткин А.И. и др., 2017).

Нами использован лазерный анализатор микроциркуляции ЛАКК – 02 (ООО научно-производственное предприятие «ЛАЗМА», № о21524: 29/03020703/5555-03).

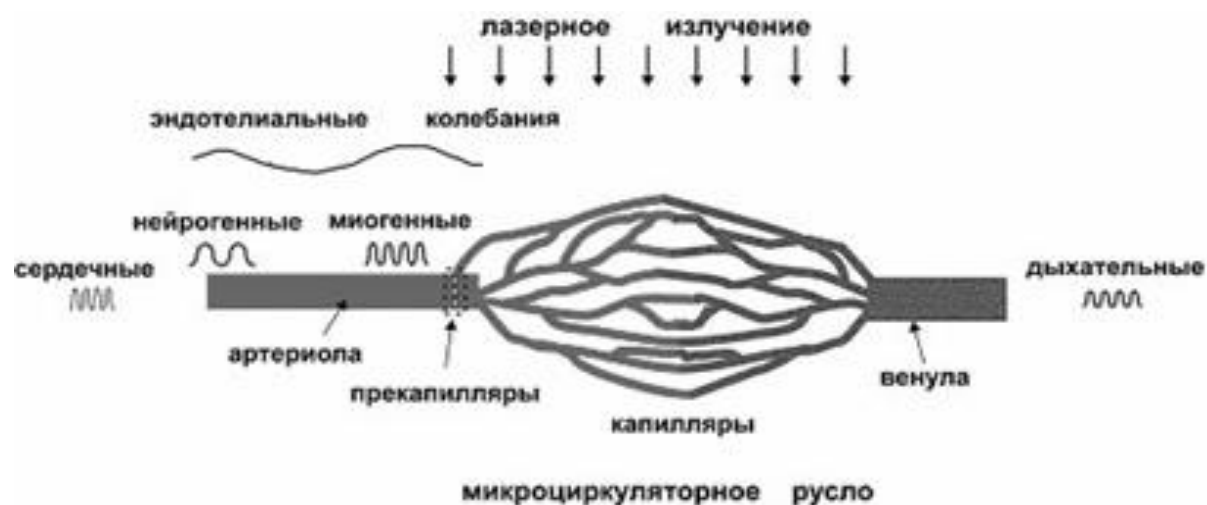
Основной показатель - показатель микроциркуляции (ПМ), который прямо пропорционален сумме и скорости движения форменных элементов. ПМ регистрируется в относительных, либо перфузионных единицах.

Значение показателя микроциркуляции определяется вариациями во времени как основными базисными параметрами сосудов, диаметрами последних, контролирующая активными механизмами и пассивными составляющими системы микроциркуляции. К пассивным факторам относят пульсовую волну со артерий и подсасывающее действие «дыхательного насоса» венозной системы. Описанные колебания контактируют с кровотоком в зондируемой области.

Влияние описанных систем на кровоток ведет скоростных показателей и концентрации форменных элементов. Активные механизмы реализуют поперечные осцилляции тока крови в следствии чередования мышечной динамики сосудов. Пассивные факторы фиксируют продольные колебания тока крови, выражающиеся в периодическом изменении кровеносного объема. В артериолах суть динамики объема реализуется пульсовой волной, в венах – рабочей динамикой «дыхательного насоса» [Дремин В.В., Крупаткин А.И. и др., 2017; К.Г. Шаповалов, 2019].

Объект приложения активных факторов - мышечный слой сосуда. Пассивные факторы влияют на сосудистую стенку с помощью микроколебаний тока крови. В

условиях физиологии таргетом нейрогенной регуляции являются артериолы и артериоло-венулярные анастомозы, миогенная регуляция осуществлена на прекапиллярах, эндотелиальная регуляция сосудистого диаметра фиксирует прекапиллярное звено. В капиллярах регистрируются миогенные и пульсовые осцилляции, которые проникающие с током крови при движении через прекапилляры. Регистрируемый в ЛДФ-грамме колебательный процесс есть результат наложения осцилляций, обусловленных активными и пассивными факторами (Рисунок 3) [Дремин В.В., Крупаткин А.И. и др., 2017].



**Рисунок 3** - Схема локализации влияния на мышцы сосуда активных факторов

Выявленные колебания тока крови рассчитываются путем вейвлет-преобразования. Подобный математический алгоритм нашел широкое применение при анализе сигналов физиологической природы (Stefanovska A., 1999), наилучшим образом выявляет периоды коротких и длинных процессов. В основе программы Вейвлет-преобразования лежит поочередное перемножение массива показателей ЛДФ-граммы на массив, содержащий вейвлеты для различных частот. В результате чего выявляются максимальные амплитуды в нейрогенном и эндотелиальном пульсовом диапазоне.

Нейрогенный тонус прекапиллярных сосудов и миогенный тонус метартериол и прекапиллярных сфинктеров определяются прикладной компьютерной



программой. Показатель шунтирования (ПШ) вычисляется по формуле:  $ПШ = МТ/НТ$  [Дремин В.В., Крупаткин А.И. и др., 2017].

Обследование пострадавших и лиц контрольной группы осуществлялось с соблюдением стандартных условий необходимых для ЛДФ [Дремин В.В., Крупаткин А.И. и др., 2017].

У пострадавших с криотравмой нижних конечностей колебания тока крови фиксировались в I межплюсневом промежутке, а также в проекции бугристости большеберцовой кости.

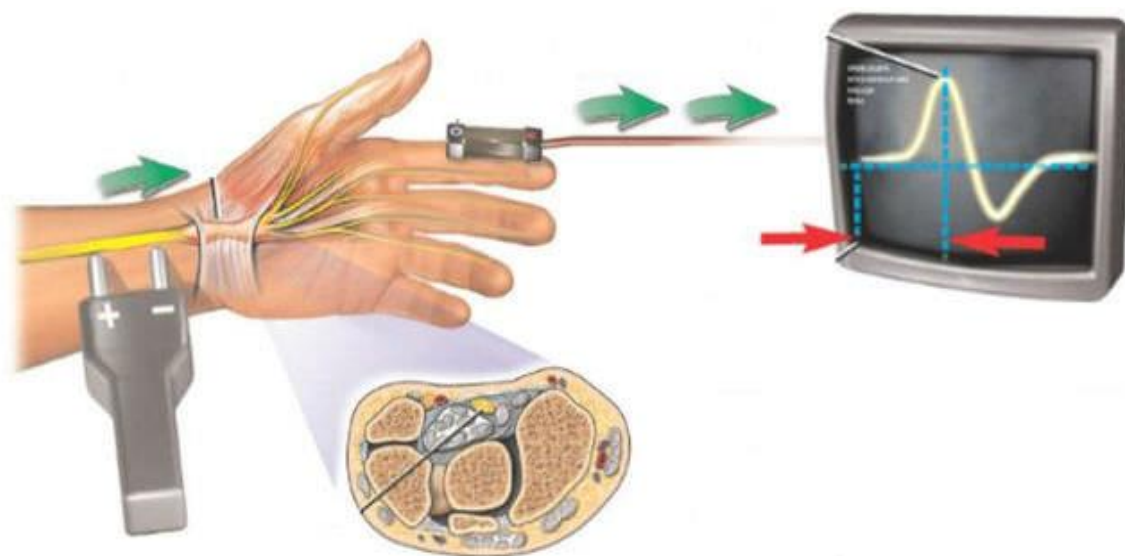
Исследования осуществлялось в одно и то же время суток. Перед исследованием пациенты и лица контрольной группы находились в состоянии не изменяющем микроциркуляторное русло. При тестировании пострадавшие и лица контрольной группы находились в положении лежа. Исследования осуществлялось при стабильной комнатной температуре.

ЛДФ-показатели фиксировались в течение 12 минут. Оценивались: показатель микроциркуляции (ПМ), характеризующий поток форменных элементов за единицу времени через единицу объема ткани. Перечисленные показатели измеряли в перфузионных единицах (пф.ед.). С помощью вейвлет-анализа выявлялся показатель шунтирования (ПШ) и максимальная амплитуда нейрогенного диапазона (Ан).

Криотравмы характеризуются «конусовидностью» поражения – большая выраженность изменений и дегенерации тканей локализуется именно в дистальных сегментах конечностей. Следовательно, акральные участки пораженной конечности непригодны в качестве исследуемых областей при глубоких отморожениях. При регистрации и фиксации сигнала в области некротического поражения тканей и выраженного перифокального воспаления выявляются показатели, характерные для данных процессов воспаления, но не для фиксации показателей микроциркуляторного русла. В связи с этим оценивались колебания тока крови в более проксимальных сегментах пораженной конечности и проксимальнее предполагаемой границы повреждения.

### Методика исследования периферической иннервации

Электронейромиография (ЭНМГ) – это комплекс нейрофизиологических методов исследования, используемых в диагностике заболеваний и приобретенных патологических состояний периферической нервной системы: болезней двигательных нейронов, корешков, сплетений, периферических нервов, нервно-мышечных синапсов и мышц, а также экзогенных повреждений нейронов любой этиологии. Метод основан на исследовании нейроассоциированных биоэлектрических потенциалах, возникающих в скелетных мышцах человека при возбуждении мышечных волокон с регистрацией электрической активности мышц в следствии возбуждения и генерации импульса в нервных волокнах.



**Рисунок 4** - Схема фиксации электро-нейромиографических потенциалов

Впервые применил метод электромиографии по отношению к человеку в 1907 немецкий учёный Г. Пипер [von Piper, H, b. 1877, *Elektrophysiologie menschlicher Muskeln*, von H. Piper. Berlin, J.Springer, 1912]. В отношении пациентов с локальной холодовой травмой ЭНМГ использована впервые (Рисунок 4).

ЭНМГ включает в себя три основные методики: спонтанную электронейромиографию, стимуляционную электронейромиографию и игольчатую электромиографию.

В нашем случае способ осуществляют следующим образом: пациентам с местной холодовой травмой III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей до начала лечения с помощью аппарата Нейро-ВМП, компании Нейрософт (г. Иваново) проводят накожную стимуляционную электронейромиографию пораженной конечности импульсами в диапазоне 10-35 мА, продолжительностью 200-300 мС.



**Рисунок 5** - Этапы проведения стимуляционной электронейромиографии

В положении больного лежа на спине на медиальную поверхность пораженной стопы располагают регистрирующий активный электрод (Ра) и регистрирующий референтный электрод (Рр). Место расположения Ра – на 1 см вниз и вперед от бугристости ладьевидной кости, место расположения Рр – на 5 см дистальнее по оси стопы в месте основания головки 1 плюсневой кости. Стимулирующий электрод располагают позади медиальной лодыжки в углублении таранной кости и проводят стимуляцию (Рисунок 5).

## **Исследование содержания в крови циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК)**

Количество циркулирующих эндотелиоцитов в крови определялось методом Hladovec (1978). Метод основан на фиксации клеток совместно с кровяными пластинками с осаждением последних с помощью АДФ. С этой целью использовали свежую кровь. Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали 10 мин при 1000 оборотов в минуту. После чего 1 миллилитр плазмы смешивали с 0,2 мл натриевой соли АДФ в концентрации 1 мг/мл. Смесь перемешивали в течение 10 мин. Полученный биологический субстрат куммулировали в другую емкость и центрифугировали для удаления тромбоцитарных агрегатов. Поверхностный слой собирали в следующую пробирку и центрифугировали для осаждения эндотелиальных клеток, затем верхний слой плазмы устранили, полученный осадок смешивали с 0,1 мл 0,9% раствора, перемешивая стеклянной палочкой. Полученной суспензией заполняли камеру Горяева и подсчитывали в двух сетках с помощью контрастной микроскопии.

## **Определение лимфоцитарно-тромбоцитарной коагрегации (ЛТА)**

Общий пул лимфоцитов получали наслаиванием свежей гепаринизированной крови, разбавленной в 2 раза средой 199, на урографин-фиколл (плотность 1,077) и центрифугированием в пробирках при 1500 об/мин в течение 40 мин., интерфазное кольцо забирали пастеровской пипеткой, трижды отмывали средой 199 и готовили взвесь лимфоцитов. Тромбоциты выделяли добавлением 1% раствора ЭДТА в пробирку с цельной кровью больного в соотношении 9:1 и центрифугированием при 1000 об/мин в течение 7 минут. Богатую кровяными пластинками плазму отсасывали, заполняли ею пробирки и инкубировали 30 минут при 37°C. К пулу лимфоцитов в концентрации  $(2—3) \times 10^6$  клеток в 1 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) добавляли аутологичную плазму, богатую тромбоцитами, в объемном соотношении 2:1. Смесь инкубировали в течение 30

мин, после чего микроскопировали в счетной камере. Подсчитывали число лимфоцитов и количество коагрегатов лимфоцитов с тромбоцитами (так называемых лимфоцитарно-тромбоцитарных розеток, за которые принимали лимфоцит, присоединивший не менее 3 кровяных пластинок). Степень адгезии оценивали по количеству тромбоцитов, агрегированных с лимфоцитом (оригинальный метод Ю.А. Витковского, 2004).

**Исследование уровня содержания молекул межклеточной адгезии (CD40L, s-Sel, e-Sel), асимметричного диметиларгинина (ADMA), периферического нейрофиламента (pNF-H)**

Уровень CD40L, s-Sel, e-Sel, ADMA, pNF-H в крови больных и жидкости пузырей устанавливался методом твердофазного ИФА с использованием наборов реагентов фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Измерение их уровня осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы производителя.

**Изучение уровня содержания сывороточного кальпротектина (MPR8/14), молекул межклеточной адгезии (ICAM – 1, VCAM – 1), миелопероксидазы (MPO), матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (MMP – 2, MMP – 9, TIMP – 1, TIMP – 2)**

Содержание сывороточного кальпротектина, молекул межклеточной адгезии, миелопероксидазы, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов изучали с помощью диагностического планшета LEGENDplex™ фирмы BioLegend (San-Diego, CA92121, USA, 2019) [Product tipe: Recombinant Proteins, Cytokines, Growth Factors].

Наборы LEGENDplex™ BioLegend представляют собой предопределенных панелей с набором характеристик.

Каждый набор содержит четко определенное количество реагентов для проведения не менее 100 тестов. Анализ выполняется в 96-луночной фильтровальной пластине. LEGENDplex™ от BioLegend - это иммуноанализ на

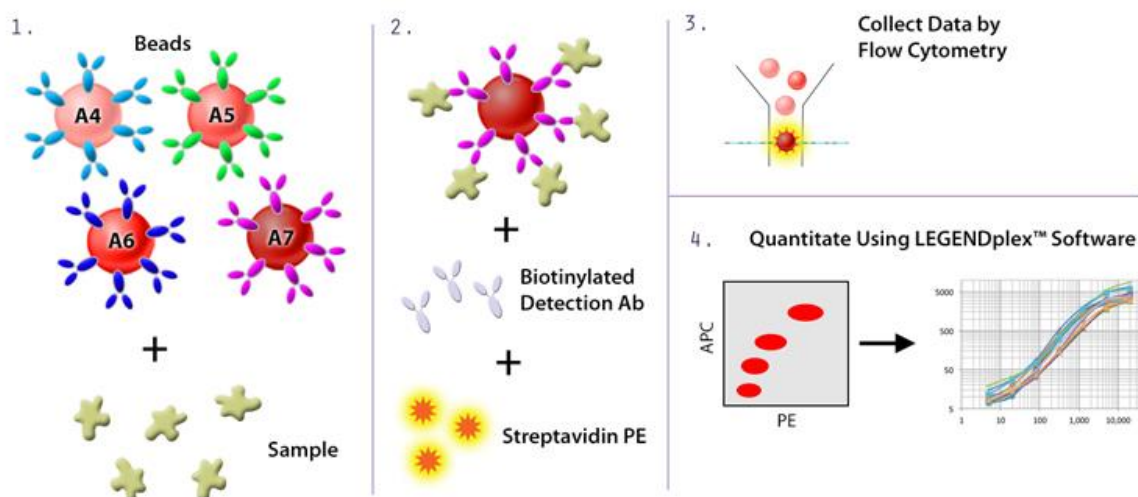
основе кластеров, который использует те же основные принципы сэндвич-иммуноанализа, при котором растворимый элемент захватывается между двумя антителами.

Популяции кластеров бывают двух размеров и отличаются уровнем флуоресценции, что позволяет четко отличать их друг от друга. Каждый набор кластеров конъюгирован с определенным антителом на поверхности и служит в качестве захвата кластера для этого конкретного антитела. Когда выбранная панель кластеров смешивается вместе и инкубируется с определенным образцом, кластеры связываются с соответствующими антителами.

После промывки добавляют биотинилированные детекторные антитела, и каждое детекторное антитело связывается со своим специфическим кластером, образуя таким образом сэндвичи захватных кластерно-детекторных антител. Затем добавляется стрептавидин-фикоэритрин, который будет связываться с биотинилированными детекторными антителами, обеспечивая флуоресцентный сигнал с интенсивностью, пропорциональной количеству связанного кластера.

Для каждой популяции кластеров интенсивность флуоресценции определяется с помощью проточного цитометра.

## PRINCIPLE OF THE ASSAY



**Рисунок 6** - Схема детектирования кластеров и антител на фильтровочной пластине LEGENDplex™ Biolegend [354]

Концентрация конкретного кластера определяется на основе известной стандартной кривой с помощью программного обеспечения для анализа результатов LEGENDplex™ с помощью уникального USB-ключа Biolegend™ (Рисунок 6).

### **Исследование уровня содержания вазоактивных молекул эндотелиального геноза**

Определение нитритов крови осуществлялось непрямым методом (Голиков П.П. и соавт., 2004). Пробы сыворотки крови непосредственно перед исследованием размораживали и депротеинизировали добавлением к 0,4 мл сыворотки 0,8 мл 0,5N NaOH и 0,8 мл 10% раствора сульфата цинка. Содержимое пробирки перемешивали и центрифугировали 15 мин при 9000 g. Надосадочную жидкость смешивали с равным объемом реактива Грисса (1% сульфаниламид, 0,1% нафтилендиамин, 2,5% фосфорная кислота) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Измерение абсорбции раствора проводили на спектрофотометре при длине волны 546 нм. Концентрацию нитрита определяли с помощью стандарта нитрита натрия.

#### **2.2.3. Статистическая обработка полученных результатов**

При проведении статистического анализа автор руководствовался принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL). Учитывая распределение данных отличное от нормального, результаты исследования представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>). 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. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и

процентных долей. Сравнение номинальных данных исследования проводилось при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона, 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. Основываясь на отсутствии нормального распределения, для оценки связи между двумя количественными показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ). Исходя из полученного значения  $\rho$ , выявлена теснота связи по шкале Чеддока и ее направление (прямая или обратная). Для построения моделей использовали регрессионный анализ [T. Lang et al., 2014]. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США).



### **ГЛАВА 3. Исследование состояния микроциркуляторного русла и биоэлектрической активности мышц у больных с местной холодовой травмой**

Нарушения микроциркуляции и иннервации являются важным звеном патогенеза развития множества патологических процессов сегментов конечностей: сахарный диабет, облитерирующий эндартериит, комплексный регионарный болевой синдром и др. [Т.А. Яхьяева, 2020; С. Napoli et al., 2001; Gui T. Et al., 2012].

Малоинвазивные методики исследования состояния тканей представляются перспективными в прогнозировании отдаленных результатов местной холодовой травмы и иной патологии. Оценка микрокровотока и функции эндотелия с помощью лазерной доплеровской флоуметрии существенно расширила представления о патогенезе отморожений [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. При этом измерение биоэлектрической активности нервно-мышечного аппарата при местной холодовой травме в литературе и других информационных источниках практически не встречается, хотя электронейромиография (ЭНМГ) применяется в прогнозировании исходов той или иной патологии достаточно часто [А.Г. Ремнев, 2013; С. L. Geurts, 2006].

Стимуляционная электронейромиография заключается в объективном исследовании нервно-мышечной системы посредством регистрации электрических потенциалов мышц [А.Г. Ремнев, 2013].

Некоторые из определяемых параметров, например, снижение скорости проведения возбуждения по чувствительным и двигательным волокнам, амплитуда М-ответа, резидуальная латентность и прочие имеют серьезные перспективы с точки зрения прогнозирования исходов и возможности ранней коррекции лечения при различной патологии [А.Г. Ремнев, 2013].

Однако до настоящего времени не выполнялись комплексные исследования состояния микрокровотока и биоэлектрической активности мышц при местной холодовой травме.

Состояние микроциркуляторного русла и компонентов сосудистого тонуса оценивались в различные периоды клинического течения и в зависимости от тяжести местной холодовой травмы.

### **3.1. Исследование состояния микроциркуляции, сосудистого тонуса и электронейромиографических потенциалов в разные периоды местной холодовой травмы**

Патологические изменения в тканях при отморожениях имеют стадийный, прогрессирующий характер. Актуальным является соотнесение данных проявлений с динамикой изменений микрокровотока и иннервации.

**Таблица 5** - Показатели микроциркуляции и тонуса сосудов кожи голени при отморожениях нижних конечностей (МЕ [Q1; Q3])

показатели	ПМ, пф. ед	ПШ	A(н), пф. ед
Контроль, n=50	5,92 [5,24; 6,72]	1,40 [1,26; 1,52]	0,34 [0,30; 0,37]
Пациенты на 5 сутки, n=93	3,59 [2,95; 4,28] p<0,05	1,39 [1,21; 1,54]	0,21 [0,17; 0,24] p<0,05
Пациенты на 30 сутки, n=95	3,61 [3,18; 4,01] p<0,05	1,39 [1,22; 1,56]	0,20 [0,18; 0,23] p<0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контрольной группы.

При анализе результатов осцилляций кровотока у пациентов с местной холодовой травмой нижних конечностей на 5 и 30 сутки с момента криотравмы отмечена достоверная разница между показателями группы больных с местной холодовой травмой и контролем, что можно объяснить разнонаправленностью изменений флюктуаций кровотока в различные периоды течения местной холодовой травмы. Таким образом, выделение периодов отморожений не является

формальным и временным, а обусловлено патофизиологическими изменениями в поврежденных и здоровых тканях (Таблица 5).

В позднем реактивном периоде холодовой травмы на стопе и голени регистрировалось снижение ПМ в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ). Максимальная амплитуда спектра колебаний кровотока на коже голени значительно снижалась, так, А(н) уменьшалась в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) (Таблица 5).

В периоде гранулирования и эпителизации отмечено снижение показателя ПМ в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). Максимальная амплитуда спектра колебаний кровотока в области пораженной конечности в нейрогенном диапазоне снижалась в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 6** - Показатели энмг у пациентов с криотравмой (Ме [Q1; Q3])

Показатели	Амплитуда М-ответа (мВ)	Резидуальная латентность (мс)	Скорость распространения возбуждения (мс)
Контроль, n=50	3,5 [3,37; 3,67]	3,2 [3,13; 3,32]	42,6 [41,69; 43,45]
Пациенты на 5 сутки, n=93	0,74±0,2 [0,72; 0,76] ( $p < 0,001$ )	5,5 [5,35; 5,62] ( $p < 0,001$ )	27,25 [25,98; 28,52] ( $p < 0,001$ )
Пациенты на 30 сутки, n=95	1,93 [1,78; 2,08] ( $p = 0,003$ ) ( $p_1 = 0,002$ )	4,6 [4,43; 4,74] ( $p < 0,001$ ) ( $p_1 = 0,039$ )	34,65 [32,83; 36,47] ( $p = 0,067$ ) ( $p_1 < 0,001$ )

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

$p_1$  – достоверность разницы показателей относительно больных с отморожениями в позднем реактивном периоде.

В позднем реактивном периоде в исследуемой группе амплитуда М-ответа (аМо) и скорость распространения возбуждения (СРВ) снижались относительно контроля. Резидуальная латентность (РЛ) повышалась относительно контрольной группы. Причем в позднем реактивном периоде аМо снижалась в 5 раз ( $p < 0,01$ ), СРВ – в 1,6 раза ( $p < 0,01$ ), РЛ повышалась в 1,7 раза ( $p < 0,01$ ) относительно группы контроля (Таблица 6). Подобное явление, вероятно, связано со стабильной дисфункцией эндотелия, продолжающимся постгипоксическим повреждением тканей с истощением активных механизмов регуляции тонуса, и как следствие,

рефрактерностью миоцитов перифокальных тканей. Нарушение функции мышечной проводимости опосредуется и деятельностью нервной ткани. За счет длительного поступления афферентной импульсации из зоны повреждения формируется патологическая петля с пролонгированным спазмом сосудов тканей проксимальнее линии демаркации [М.И. Михайличенко и др., 2020].

В периоде гранулирования и эпителизации отмечена тенденция к восстановлению уровня нейромышечной активности у пострадавших. Установлено, что аМо регистрировалась на уровне в 1,8 раза ( $p=0,002$ ), а РЛ выше в 1,2 раза ( $p<0,001$ ) относительно группы контроля (таблица 7). СРВ достоверно не отличалась от показателей группы контроля. Исследуемые показатели ЭНМГ имели тенденцию к восстановлению по сравнению с данными позднего реактивного периода, но, по-прежнему, отличались от уровня здоровых людей [М.И. Михайличенко и др., 2020].

Такие изменения указывали на значительное повреждение и дисфункцию эндотелия, а также на истощение активных механизмов регуляции тонуса, рефрактерности мышечного слоя сосудистой стенки и нарушение проводимости по волокнам нервной ткани. Выявленные параметры микроциркуляции фиксировали неблагоприятную динамику, при этом течение раневого процесса при криоповреждении зачастую приобретало вялотекущий и затяжной характер. Подобные изменения можно объяснить относительной близостью участка альтерации, влиянием гистометаболических и кислородзависимых механизмов регуляции.

Следовательно, динамика показателей микрокровоотока, тонуса сосудов и биоэлектрической активности мышц у пациентов с криотравмой нижних конечностей зависела от периода местной холодовой травмы.

### 3.2. Исследование состояния микроциркуляции, сосудистого тонуса и биоэлектрической активности мышц при различной тяжести местной холодовой травмы

Выдвинута гипотеза об усугублении изменений состояния микроциркуляции и биоэлектрической активности мышц в зависимости от тяжести холодовой травмы конечностей.

**Таблица 7** - Показатели микрокровотока кожи средней трети голени при отморожениях нижних конечностей (Me [Q1; Q3])

	контроль, n=50	первая группа, n=71	вторая группа, n=73	третья группа, n=69
ПМ	5,92 [5,65; 6,28]	5,01 [3,35; 6,87] p>0,05	2,93 [2,31; 3,1] p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05	6,99 [4,32; 9,37] p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
ПШ	1,40 [1,33; 1,52]	1,43 [1,00; 1,77] p>0,05	1,88 [1,37; 2,21] p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05	1,84 [1,41; 2,32] p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05
A(н)	0,34 [0,32; 0,36]	0,38 [0,21; 0,55] p>0,05	0,24 [0,15; 0,26] p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05	0,44 [0,30-0,53] p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно 1-й группы больных;

p<sub>2</sub> – достоверность разницы показателей относительно 2-й группы больных.

В исследуемых группах больных с отморожениями нижних конечностей зарегистрировано уменьшение ПМ в коже средней трети голени. Эти изменения прогрессируют с усугублением тяжести травмы, так в 1-й группе пациентов разница недостоверна, во 2-й группе ПМ снижается в 1,5 раза (p<0,05), а в 3-й группе повышается в 1,7 раза (p<0,05) (Таблица. 7). Показатель шунтирования во всех трех группах сравнения достоверно не изменялся относительно контроля (Таблица 7). Амплитуда колебаний кровотока нейрогенного диапазона у пациентов с отморожениями пальцев достоверно снижалась в 1,5 раза (p<0,05)

только у пациентов с самыми тяжелыми поражениями нижних конечностей (Таблица 7).

Динамика изменения компонентов тонуса сосудов, параметров микроциркуляции и биоэлектрической активности мышц при местной холодовой травме нижних конечностей, весьма вероятно, являются факторами, которые приводят к неблагоприятному течению раневого процесса. В связи с чем многим пациентам приходится выполнять повторные некрэктомии и ампутации, а приживление кожных трансплантатов происходит гораздо хуже [Михайличенко М.И. и др., 2020].

**Таблица 8** - Показатели энмг у пациентов с криотравмой (МЕ [Q1; Q3])

Показатели	Контроль, n=50	Первая группа, n=71	Вторая группа, n=73	Третья группа, n=69
Амплитуда М-ответа (мВ)	3,5 [3,37; 3,67]	1,16 [1,00; 1,30] p<0,001	0,74 [0,60; 0,90] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	0,53 [0,40; 0,63] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Резидуальная латентность (мс)	3,2 [3,13; 3,32]	4,48 [4,18; 4,83] p<0,001	5,48 [5,28; 5,73] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	7,56 [7,3; 7,8] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Скорость распространения возбуждения (мс)	42,6 [41,61; 43,45]	36,64 [33,75; 39,00] p<0,001	27,25 [25,75; 29,25] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	21,36 [20,00; 22,25] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно 1-й группы больных;

p<sub>2</sub> – достоверность разницы показателей относительно 2-й группы больных.

У пострадавших с местной криотравмой отмечены выраженные изменения периферической иннервации. Нейропатия прогрессирует с увеличением уровня повреждения. Динамика схожа с изменениями показателей ЛДФ. Амплитуда моторного ответа у пациентов 1-й группы снижалась в 3 раза (p<0,001), у больных 2-й группы – в 4,8 раза (p<0,001), у пострадавших 3-й группы – в 7 раз (p<0,001) (Таблица 8). Резидуальная латентность у пациентов 1-й группы повышалась в 1,4

раза ( $p < 0,001$ ), у больных 2-й группы – в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ), у пострадавших 3-й группы – в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ) (таблица 8). Скорость распространения возбуждения у пациентов 1-й группы снижалась в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), у больных 2-й группы – в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ), у пострадавших 3-й группы – в 2 раза ( $p < 0,001$ ) (Таблица 8) [Михайличенко М.И. и др., 2020].

Нередко течение раневого процесса при холодовой травме осложняется сепсисом, тромботическими осложнениями. Среди отдаленных последствий отморожений выделяют хронические заболевания сосудов конечностей, нарушения иннервации, костно- и миодистрофические процессы. Предикторами и пусковыми элементами при этом, очевидно, также являются нарушения микроциркуляции и тонуса сосудов.

Таким образом, при усугублении тяжести местной холодовой травмы изменения показателей микроциркуляции и сосудистого тонуса становятся более выраженными.

### **3.3. Использование метода ЛДФ для получения критериев раннего прогнозирования течения раневого процесса при местной холодовой травме**

Внимание многих исследователей, занимающихся проблемами холодовых поражений, отдается вопросам прогнозирования глубины поражения тканей в ранние сроки с момента травмы (дореактивный и ранний реактивный период) [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; Ю.С. Винник и соавт., 2011; D. Jones et al., 2018; N. Patel et al., 2017]. Однако, следует отметить главенство субъективных, в основном визуальных, методов определения степени отморожения. По окончании раннего реактивного периода, то есть с 3-х суток с момента получения холодовой травмы, формируется зона некроза и определение степени отморожения не вызывает серьезных затруднений. В последующем решается вопрос о проведении некрэктомий, ампутаций и экзартикуляций сегментов конечностей, применении органосберегающей, либо более радикальной тактики хирургического

вмешательства. При этом отсутствуют объективные критерии прогнозирования дальнейшего течения раневого процесса при криоповреждении.

Учитывая функциональность дистальных сегментов конечностей (которые в основном и поражаются), при проведении оперативного пособия требуется органосберегающая тактика. Вместе с тем приходится часто сталкиваться с затяжным, вялым течением раневого процесса при криотравме. Некоторым больным приходится выполнять повторные некрэктомии и ампутации, аутодермопластики. Нередко течение раневого процесса осложняется сепсисом, тромботическими осложнениями, декомпенсацией сопутствующей патологии. Сроки госпитализации у пострадавших с криотравмой по сравнению с травматическими повреждениями и термической травмой длиннее, а результаты реабилитации значительно хуже. Этот факт мы связываем с особенностями криоальтерации.

При холодовой травме в участках конечностей происходят выраженные изменения тканей: повреждается эндотелий сосудов, формируется неврит, нарушается работа систем иммунитета, сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов. Следовательно, снижается репаративный потенциал тканей. Преморбидное состояние кровообращения играет значительную роль в патогенезе криотравмы. Доказано, что нарушения микроциркуляции (при сахарном диабете, облитерирующих заболеваниях сосудов конечностей, повторных отморожениях, вибрационной болезни и др.) значительно ухудшает течение раневого процесса. При местной холодовой травме ремоделируется микроциркуляция: открываются артериовенозные шунты, происходит трансформация кровотока, провоцируется дефицит кровотока нутритивного русла [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; K. Jenabzadeh et al., 2006].

У больных с глубокими отморожениями преклонного возраста, страдающих тяжелыми сопутствующими соматическими заболеваниями, при развитии септических осложнений предполагают неблагоприятное течение раневого процесса и определяют показания к более радикальному вмешательству.



Широко используемый в течение десятков лет реовазографический метод не позволяет прогнозировать течение раневого процесса, а характеризует степень кровенаполнения конечности, не отражая состояние микроциркуляторного русла и тканевой перфузии. На фоне сохраненной циркуляции по артериям и венам, достаточном общем содержании крови в пораженном сегменте способ не может дифференцировать сброс крови через артериовенозные шунты от капиллярного кровотока.

Для повышения точности прогноза предлагается проводить ЛДФ-исследование кровотока в пораженной конечности. С его помощью определяли величину показателя микроциркуляции крови, значения тонуса сосудов и амплитудо-частотного спектра колебаний, получали коэффициент  $K$ , который являлся отношением произведения значений показателя микроциркуляции крови и максимальной амплитуды пульсовых колебаний к произведению показателей миогенного и нейрогенного тонуса. По его значению прогнозировалось определенное течение раневого процесса при глубокой криотравме нижних конечностей [М.И. Михайличенко и др., 2007].

Способ осуществлялся следующим образом. Больному в горизонтальном положении лежа на спине на переднюю поверхность в средней трети голени пораженной конечности устанавливался датчик аппарата ЛАКК-02. В течение 7 минут регистрировались ритмы колебаний кровотока в микроциркуляторном русле и после вейвлет-преобразования осцилляций на персональном компьютере получали параметры амплитудно-частотного спектра и тонуса сосудов. Затем рассчитывалась величина  $K$  по формуле  $K=(ПМ \times Ас)/(НТ \times МТ)$ . При значении  $K < 0,03$  прогнозировалось неблагоприятное течение раневого процесса [М.И. Михайличенко и др., 2007].

Увеличение показателя микроциркуляции и максимальной амплитуды пульсовых колебаний свидетельствовало об увеличении притока крови в артериальное русло. А возрастание показателей нейрогенного и миогенного тонуса – о спазме микрососудов и ухудшении тканевой перфузии (Крупаткин А.И., Сидоров В.В., 2013). Показатель  $K$  прямо пропорционален ПМ и Ас и

обратно пропорционален НТ и МТ. Метод позволяет учитывать в комплексе как исходное состояние микрокровотока (наличие облитерирующих заболеваний сосудов, патологию эндотелия), так его изменения вследствие холодового воздействия и течения раневого процесса (спазм, артериовенозный сброс крови, повреждение эндотелия, нарушения нейрогуморальных механизмов регуляции тонуса сосудов).

Измерения проводили больным с отморожениями нижних конечностей III-IV степени после 3-х суток с момента травмы, когда необходимо решить вопрос о дальнейшей тактике лечения. При  $K < 0,03$  наблюдалось затяжное вялое течение раневого процесса, удлинялись сроки выполнения аутодермопластики, возникала потребность в повторных некрэктомиях, увеличивались сроки лечения. Раневые отпечатки приобретали регенеративный тип на 4-6 дней позже. В случае отморожения одной стопы показатель  $K$  на здоровой конечности был больше в десятки раз, что подтверждает эффективность метода. Использование предлагаемого способа прогнозирования позволяло выделить группу больных, которым требовалось более радикальное иссечение тканей при некрэктомии, а также проведение интенсивной терапии в послеоперационном периоде, направленной на улучшение микрокровотока [М.И. Михайличенко и др., 2007].

Способ применялся при лечении 50 пациентов с местной холодовой травмой нижних конечностей. Точность прогноза осложненного течения послеоперационного периода составила 85%.

При более радикальном подходе к некрэктомии и проведении консервативной терапии, направленной на улучшение тканевой перфузии, у больных с  $K < 0,03$  не отмечалось затяжного течения раневого процесса и не требовалось проведения повторных операций.

Таким образом, использование метода ЛДФ позволяло прогнозировать течение раневого процесса при местной холодовой травме конечностей.

### **3.4. Использование ЭНМГ для прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей**

Известно, что в начальном периоде отморожения определить уровень повреждения тканей не представляется возможным [L. Jones et al., 2018; G. J. Jurkovich et al., 2007]. Отсутствие зоны демаркации создает определенные сложности в определении объема проводимой терапии и прогнозе дальнейшего течения повреждения. Ситуация отягощается достаточно частым наличием сопутствующей патологии кровообращения и иннервации тканей [А.А. Лебедь и соавт., 2010; McIntosh S.E., et al. 2014; Mohr W.J. et al. 2009; Yanagisawa H. 2013]. В связи с этим частота неблагоприятного течения раневого процесса при местной холодовой травме достигает порядка 35–40 % [M. Kaller, 2010]. Это связано с выбором неадекватного уровня ампутации, ввиду регионарной эндотелиальной дисфункции и тяжелого нарушения периферической иннервации, которые провоцируют увеличение зоны паранекроза значительно выше видимого повреждения. Ранний прогноз уровня холодовой травмы позволяет своевременно определить условную линию демаркации, что позволяет планировать сроки и объем необходимого лечения, как следствие, профилактирует развитие послеоперационных осложнений [M. A. Khanday et al., 2015; J. J. Knapik et al., 2020; K. W. Russell et al., 2013; C. F. Kingma et al., 2019].

Для повышения точности и упрощения способа прогнозирования уровня повреждения при местной холодовой травме III–IV степени дистальных сегментов нижних конечностей проводят электронейромиографию пораженной конечности, определяют амплитуду М-ответа (AMR (amplitude of M-response)), скорость распространения возбуждения (SEP (speed of excitation's propagation)), резидуальную латентность (RL (residual latency)) и рассчитывают коэффициент уровня повреждения по формуле:  $K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL$ , где: SEP - скорость распространения возбуждения, AMR - амплитуда М-ответа, RL - резидуальная латентность; 1,5 – константа уравнения линейной регрессии; 0,04, 0,15, 0,355 – коэффициенты уравнения линейной регрессии, при значении К

менее 2 прогнозируют отморожение на уровне пальцев стопы, при К от 2 до 3 – на уровне предплюсно-плюсневого сочленения, при К более 3 – тотальное поражение стопы [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2019].

Местная холодовая травма сопровождается деградацией периферических нервов [К.Г. Шаповалов, 2019], поэтому в качестве прогностических критериев выбраны показатели электронейромиографии (ЭНМГ). ЭНМГ в настоящее время является единственным объективным методом оценки функционального состояния периферической нервной ткани. Оценка значимости параметров электронейромиографии (амплитуда М-ответа, резидуальная латентность, скорость распространения возбуждения) нижних конечностей произведена по данным построения математической модели, основанной на методах линейной регрессии [Т. Lang et al., 2014]. Максимальная корреляция наблюдалась между уровнями поражения тканей и показателями электронейромиографии ( $r = 0,97$ ).

Способ осуществляют следующим образом: пациентам с местной холодовой травмой III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей при поступлении в стационар проводят накожную стимуляционную электронейромиографию пораженной конечности импульсным переменным током в диапазоне 10-35 мА, продолжительностью 200-300 мС с помощью аппарата Нейро-ВМП, компании Нейрософт (г. Иваново). Регистрирующий активный электрод располагают на 5 см ниже бугристости большеберцовой кости и на 1 см латеральнее гребня большеберцовой кости, регистрирующий референтный электрод располагают на 6 см ниже активного регистрирующего электрода, в проекции сухожилия передней большеберцовой мышцы и проводят стимуляцию [А.Г. Ремнев, 2013].

Определяют показатели ЭНМГ: амплитуду М-ответа (AMR (amplitude of M-response)) (мВ), резидуальную латентность (RL (residual latency)) (мС) и скорость распространения возбуждения (SEP (speed of excitation's propagation)) (мС). Рассчитывают коэффициент уровня повреждения по формуле:  $K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL$ ; где: SEP - скорость распространения возбуждения, AMR - амплитуда М-ответа, RL - резидуальная латентность; 1,5 –

константа уравнения линейной регрессии; 0,04, 0,15, 0,355 – коэффициенты уравнения линейной регрессии, при значении К менее 2 прогнозируют отморожение на уровне пальцев стопы, при К от 2 до 3 – на уровне предплюсноплюсневого сочленения, при К более 3 – тотальное поражение стопы.

Данный способ использован для прогнозирования уровня поражения при местной холодовой травме нижних конечностей у 135 пациентов. Результаты представлены в Таблице 9.

**Таблица 9** - Уровень поражения при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей (Me [Q1; Q3])

Кол-во больных (n)	Возраст, лет	AMR (мВ)	SEP (мС)	RL (мС)	Коэффициент К	Уровень повреждения
41	40,5 [36,3; 45,1]	1,16 [1,02; 1,23]	36,68 [33,4; 41,3]	4,48 [3,99; 4,9]	1,3 [1,01; 1,5]	поражение на уровне пальцев стопы
45	40,3 [32,3; 43,1]	0,74 [0,5; 0,91]	27,25 [22,1; 29,3]	5,48 [4,99; 6,01]	2,6 [2,3; 2,9]	поражение до уровня средней трети стопы
49	37 [34,3; 43,1]	0,53 [0,46; 0,59]	21,36 [19,7; 23,1]	7,56 [7,01; 7,99]	3,8 [3,3; 4,1]	тотальное поражение стопы

Эффективность способа прогнозирования уровня поражения при местной холодовой травме III–IV степени дистальных отделов нижних конечностей составляет 91%.

### **3.5. Использование ЭНМГ для прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме нижних конечностей**

Проблема прогноза течения холодовой травмы является одной из самых актуальных в современной термической травме. Частота осложнений при местной холодовой травме варьирует от 23,5 до 35% [L. Jones et al., 2018; G. J. Jurkovich et al., 2007]. При сопутствующей патологии кровообращения и иннервации (нейроваскулит, облитерирующие заболевания сосудов, сахарный диабет, травмы

и т.д.) объём поражения, а также длительность течения раневого процесса увеличиваются [А.А. Лебедь и соавт., 2010; McIntosh S.E., et al. 2014; Mohr W.J. et al. 2009; Yanagisawa H. 2013]. На первое место в структуре осложнений выходит нагноение мягких тканей и несостоятельность культи после оперативного лечения, а также холодовой нейроваскулит с трофическими нарушениями дистальных сегментов конечностей. На ранних сроках травмы не всегда удается определить точную зону демаркации, поэтому прогноз, как правило, не ясен. Ранний прогноз позволяет выполнить коррекцию лечения, что способствует предотвращению развития послеоперационных осложнений [М. А. Khanday et al., 2015; J. J. Knapik et al., 2020; K. W. Russell et al., 2013; C. F. Kingma et al., 2019].

Для упрощения и повышения точности способа прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей проводят электронейромиографию пораженной конечности, определяют амплитуду М-ответа, рассчитывают коэффициент развития осложнений по формуле:  $K = 1,7 \times АМА - 0,65$ , где: АМА – амплитуда М-ответа (мВ), 0,65 - константа уравнения линейной регрессии, 1,7 - коэффициент уравнения линейной регрессии, и при значении коэффициента К менее 1,0 прогнозируют осложненное течение раневого процесса в послеоперационном периоде [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2019].

Местная холодовая травма сопровождается деградацией периферических нервов, поэтому в качестве прогностического критерия выбран показатель электронейромиографии (ЭНМГ). ЭНМГ в настоящее время является единственным объективным методом оценки функционального состояния периферической нервной ткани. Данный метод позволяет прогнозировать осложненное течение послеоперационного периода при большинстве заболеваний, сопровождающихся деградацией периферических нервов. Оценка значимости параметров электронейромиографии (амплитуда М-ответа, резидуальная латентность, скорость распространения возбуждения) нижних конечностей произведена по данным построения математической модели,

основанной на методах линейной регрессии [Т. Lang et al., 2014]. Максимальная корреляция наблюдалась между частотой развития послеоперационных осложнений и амплитудой М-ответа ( $r = 0,96$ ).

Способ осуществляют следующим образом: пациентам с местной холодовой травмой III–IV степени дистальных сегментов нижних конечностей до начала лечения с помощью аппарата Нейро-ВМП, компании Нейрософт (г. Иваново) проводят накожную стимуляционную электронейромиографию, определяют амплитуду М-ответа, рассчитывают коэффициент развития осложнений по формуле:  $K = 1,7 \times АМА - 0,65$ , где: АМА – амплитуда М-ответа (мВ), 0,65 – константа уравнения линейной регрессии, 1,7 – коэффициент уравнения линейной регрессии, и при коэффициенте К менее 1,0 прогнозируют осложненное течение раневого процесса в послеоперационном периоде.

Данный способ использован для прогнозирования осложненного течения раневого процесса в послеоперационном периоде при местной холодовой травме нижних конечностей у 40 пациентов. Результаты представлены в Таблице 10.

**Таблица 10** - Послеоперационные осложнения при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей (M±SD)

Кол-во больных (n)	Возраст, лет (M±m)	Амп. М-ответа (мВ) (M±m)	Вид осложнений	
			Вторичный некроз	Нагноение послеоперационной раны
Пациенты с применением метода прогнозирования (n=21)	40,5±8,4	1,04±0,03	1 (1,5%)	1 (1,5%)
Группа контроля (n=19)	40±8,3	0,4±0,02	15 (79%)	2 (10,5%)

Эффективность предложенного способа прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме III–IV степени дистальных отделов нижних конечностей составляет 91%.

### **3.6. Программа ЭВМ для ранней диагностики уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени**

На основе оценки феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и значений амплитуды моторного ответа создана программа, которая предназначена для ранней диагностики уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени. Набор действий создается в специальном режиме работы пользовательского окна, в котором пользователь получает доступ к вводу данных о проценте (РА) и степени (DA) адгезии, определенных на 5 сутки от момента холодовой травмы с помощью оригинального метода оценки феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии Ю.А. Витковского и соавт. (1999), а также вводу значения амплитуды М-ответа (AMR), определенного на 5 сутки от момента холодовой травмы путем электронейромиографии пораженной конечности по стандартной методике. Вывод результата также осуществляется в проекции пользовательского окна, включает определение уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени (на уровне пальцев, дистального отдела стопы, проксимального отдела стопы, нижней трети голени, средней трети голени) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2019].

Программа носит прикладной характер, обеспечивает возможность ранней диагностики уровня поражения мягких тканей дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени, что позволяет не только в полной мере проинформировать пациента, но и оптимизировать тактику их ведения.

- Тип реализующей ЭВМ: IBM PC - совместимый ПК;
- Язык программирования: объектно-ориентированный язык программирования: Object Pascal (Borland Delphi);
- Вид и версия операционной системы: все операционные системы линейки Windows;
- Объем программы: 668 Кб.



## **ГЛАВА 4. Исследование уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов у пациентов с местной холодовой травмой**

Не вызывает сомнений, что в патогенезе криотравмы основополагающая роль принадлежит эндотелиальной дисфункции [Ю.С. Винник и соавт., 2011; В.А. Туманский и соавт., 2017; J. A. Kuht et al., 2019; T. Küpper et al., 2003; L. Laskowski-Jones et al., 2018; K. J. Bruen et al., 2007]. Поврежденные холодом и вторичными процессами альтерации эндотелиоциты, а также привлеченные в очаг воспаления клетки инкретируют большое количество биологически активных веществ, в том числе матриксные металлопротеиназы (ММР) и их ингибиторы (ТИМР).

Исследованиями последних лет показано, что коллагеназы, а также их ингибиторы играют существенную роль в патогенезе повреждения соединительной ткани и ее фиброзе при разной патологии [E. Lopez-Rivera et al., 2005; M. Pino, 2005; H. Zhang et al., 2011]. Коллагеназы являются  $Zn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  зависимыми индуцируемыми эндогенными пептидазами, участвующими в перестройке тканей, путем деструкции ее органических компонентов, а также обмена белков межклеточного матрикса. Секреция ММР происходит под влиянием цитокинов, выделяемых эндотелиоцитами, фибробластами, макрофагами, тромбоцитами [Zhang et al., 2011; J. Gilabert Estelle's, 2007].

### **4.1. Содержание матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в разные периоды криповреждения**

Обращает на себя внимание повышение уровня ММР–2 и ММР–9 в сыворотке крови у пациентов с МХТ относительно группы контроля в ранние сроки отморожения (Таблица 11). В поздние сроки с момента травмы уровень ММР–2 снизился до значений контрольной группы, а показатели ММР–9 оставались

значительно выше нормы. Данный факт патогенетически обосновывает большое количество осложнений течения раневого процесса у пациентов с МХТ.

**Таблица 11** - Содержание матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в разные периоды криоповреждения (Ме [Q1; Q3])

	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)
Контроль, n = 50	2,3 [2,16; 2,45]	32,00 [28,55; 35,37]	734,4 [733,51; 770,20]	247,2 [232,19; 257,81]
Пациенты на 5 сутки, n=93	7,97 [7,59; 8,20] p<0,001	448,86 [ 418,33; 466,28] p<0,001	1259,2 [1230,83; 1342,35] p<0,001	555,2 [528,46; 578,94] p<0,001
Пациенты на 30 сутки, n=95	4,53 [4,27; 4,92] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	354,14 [343,65; 375,35] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	1481,6 [1462,76; 1646,89] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	478,4 [472,6; 555,55] p<0,001 p <sub>1</sub> =0,024

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно больных с отморожениями в позднем реактивном периоде.

В позднем реактивном периоде у пострадавших с криоповреждением уровень MMP-2 в сыворотке крови в 3,4 раза больше относительно контроля (p=0,011), на 30 сутки – значения MMP-2 не отличаются показателей контроля (p=0,103) (Таблица 11). Уровень MMP-9 у пострадавших с местной холодовой травмой на 5 сутки в 14,5 раз больше показателей контроля (p=0,002), на 30 сутки – в 12,5 раз выше относительно группы здоровых добровольцев (p<0,001) (Таблица 11).

В позднем реактивном периоде у пациентов с криоповреждением уровень TIMP-1 в 1,7 раза выше относительно контроля (p<0,001), на 30 сутки – значения TIMP-1 увеличилось в 2 раза относительно контроля (p<0,001) (таблица 11). Уровень TIMP-2 у пациентов на 5 сутки с момента криоповреждения в 2,3 раза больше показателей контроля (p<0,001), на 30 сутки – в 2,2 раз больше относительно группы контроля (p<0,001) (Таблица 11) [М.И. Михайличенко и др., 2019].

Повышенное содержание ингибиторов матриксных металлопротеиназ, вероятно, указывает на попытку со стороны организма стабилизировать

формирующуюся катастрофу в очаге альтерации. Нами выявлено резкое повышение ингибиторов матричных металлопротеиназ (TIMP-1 и TIMP-2) во всех периодах криоповреждения. Также необходимо указать и на то, что уровень TIMP не снижается и на 30 сутки с момента криоповреждения. Данный феномен, вероятно, связан с гибелью костной ткани, так как ингибиторы матричных металлопротеиназ депонируются в основном в остеоцитах [E. Lopez-Rivera et al., 2005; M. Pino, 2005].

#### **4.2. Содержание матричных металлопротеиназ и их ингибиторов при различной тяжести отморожений**

У пациентов с криоповреждением 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 12). 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 12). У больных с отморожениями 3-й группы уровень MMP-9 увеличился в 14,5 раз относительно значений контроля ( $p < 0,001$ ) (Таблица 12).

У пациентов с криоповреждением 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 12). Уровень TIMP-2 у пострадавших с местной холодовой 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 12). У больных с отморожениями 3-й группы

уровень TIMP-2 в 2,3 раза превышает значения контроля ( $p < 0,001$ ) (Таблица 12) [М.И. Михайличенко и др., 2019].

**Таблица 12** - Содержание матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в зависимости от объема пораженных тканей (Me [Q1; Q3])

	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)
Контроль, n = 50	2,3 [2,16; 2,45]	32,00 [28,55; 35,37]	734,4 [733,51; 770,20]	247,2 [232,19; 257,81]
1 группа, n = 71	4,65 [4,43; 4,77] $p < 0,001$	126,50 [126,99; 147,95] $p < 0,001$	1488,0 [1420,76; 1540,74] $p < 0,001$	513,6 [486,84; 529,16] $p < 0,001$
2 группа, n = 73	6,78 [6,75; 7,14] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	314,50 [315,29; 326,41] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	1292,8 [1252,00; 1352,05] $p < 0,001$ $p_1 = 0,159$	536,8 [495,50; 576,50] $p < 0,001$ $p_1 = 0,778$
3 группа, n = 69	7,97 [7,59; 8,20] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	448,86 [418,33; 466,28] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	1259,2 [1230,83; 1342,35] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,007$	555,2 [528,46; 578,94] $p < 0,001$ $p_1 = 0,013$ $p_2 = 0,021$

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.

Полученные в ходе исследования данные указывают на повышение содержания матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови у пострадавших холодовой травмой. При этом значимой динамики исследуемых маркеров не происходит и в отдаленные сроки криоповреждения. Вероятно, при отморожениях реализуется значительный сбой в ремоделировании цитоскелета, репарации тканей, ангиогенеза, что создает предпосылки к затяжному течению репаративных процессов.

### 4.3. Значимость показателей динамики уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отморожении

На основании анализа уравнения линейной регрессии, в которое были включены исходные показатели (показатели уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов), определена значимость показателей в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отморожении (таблица 13).

**Таблица 13** - Значимость показателей в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отморожении

Модель	Нестандартизованные коэффициенты		Стандартизованные коэффициенты		Значимость в структуре модели
	B	Стандартная ошибка	Бета	t	
Константа	- 0,466	0,181		- 2,575	0,011
ММР-2	0,165	0,017	0,378	9,578	0,0001
ММР-9	0,003	0,0001	0,511	12,970	0,0001
ТИМР-1	- 6,809	0,0001	- 0,019	- 0,643	0,520
ТИМР-2	0,001	0,0001	0,136	4,170	0,0001

Учитывая недостаточную значимость, показатель ТИМР-1 удален из структуры исходной модели. В результате чего путем повторной линейной регрессии определена закономерность, выражающаяся формулой:  $K = 0,165 \times \text{ММР-2} + 0,003 \times \text{ММР-9} + 0,01 \times \text{ТИМР-2} - 2,5$ , наименование единиц измерения показателей - ng/ml. При значениях K от 1,0 до 4,4 прогнозируют зону деструкции на уровне пальцев стоп, при K от 4,4 до 5,4 граница предполагаемого поражения распространялась до предплюсно-плюсневого сочленения, более 5,4 – до уровня нижней трети голени (Таблица 14).

**Таблица 14** - Определение множественного коэффициента детерминации полученной модели прогнозирования уровня поражения тканей при отморожении

Модель	R	R <sup>2</sup>	Скорректированный R <sup>2</sup>	Стандартная ошибка оценки
$K = 0,165 \times \text{ММР-2} + 0,003 \times \text{ММР-9} + 0,01 \times \text{ТМР-2} - 2,5$	0,873	0,763	0,760	0,451

Учитывая значение скорректированного коэффициента детерминации (0,760), можно считать зависимость между коэффициентом K и уровнем деструкции дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме достаточно сильной.

## **ГЛАВА 5. Сывороточный кальпротектин и активность межклеточных взаимодействий при местной холодовой травме**

Выявление новых маркеров холодовой альтерации способствует более ранней диагностике глубины поражений тканей, созданию новых подходов к комплексному лечению глубоких отморожений конечностей и ускоренной реабилитации пострадавших [К.Г. Шаповалов, 2019; Ю.С. Винник и соавт., 2011, Е.А. Томина и соавт., 2008; E. Lehmuskallio, 2000; K. Heil et al., 2016].

Первое доказательство того, что эндотелий играет роль в регуляции тонуса сосудов путем продуцирования вазоактивных веществ, возникло в 1977 году [S. Moncada et al., 1977]. Позже, в 1980 году, было высказано предположение, что может существовать расслабляющий сосудистый фактор, связанный с эндотелием [R. F. Furchgott et al., 1980]. Впоследствии две независимых группы исследователей показали, что этот расслабляющий фактор представляет собой оксид азота (NO) [C. Napoli et al., 2001].

Позднее Mudau et al. (2012) выявлен еще один маркер, связанный с метаболизмом NO, а именно асимметричный диметиларгенин (ADMA). Изучение ADMA, как молекулы антагониста L-аргинина, основного субстрата NOS, - очень важный шаг в понимании процессов дегенерации сосудистой стенки на ранней, клинически немой стадии заболевания [M. V. Landim et al., 2009; О.Е. Анциферова и соавт., 2018]. Дополнительные исследования в области фундаментальной науки и клинических испытаний необходимы для понимания роли этой молекулы в качестве перспективного маркера будущих коронарных событий и возможной терапевтической цели в контексте атеросклеротического сосудистого заболевания и последствий любого повреждения [S. Della Bella et al., 2001].

В современной литературе мы не обнаружили комплексных работ, посвященных вазоактивной составляющей дисфункции эндотелия у пациентов с местной холодовой травмой. В связи этим, попытка сформировать новое звено

патогенеза местной холодовой травмы легла в основу дальнейшего изучения вазоактивных эндотелиальных метаболитов.

### **5.1. Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК у пострадавших в разные периоды криотравмы**

У пациентов с местной холодовой травмой на 5 сутки установлено снижение уровня NO в крови в 1,5 раза ( $p < 0,0001$ ). При этом и на 30 сутки с момента криопорезждения уровень NO в крови меньше в 2,5 раза ( $p < 0,0001$ ) относительно контрольной группы (Таблица 15). У пациентов с местной холодовой травмой на 5 сутки отмечено значительное снижение уровня ADMA в системном кровотоке в 4,5 раза ( $p = 0,001$ ). При этом и на 30 сутки с момента криопорезждения уровень ADMA не изменялся относительно контрольной группы (Таблица 15). У пациентов с местной холодовой травмой на 5 сутки установлено увеличение в крови уровня ЦЭК в 5,2 раза ( $p < 0,0001$ ). При этом на 30 сутки с момента криоповреждения содержание ЦЭК уменьшалось, но, по-прежнему, оставалось выше значения контроля в 1,9 раза ( $p < 0,0001$ ) (Таблица 15) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2021].



**Таблица 15** - Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК в крови пострадавших в разные периоды криотравмы (Ме [Q1; Q3])

Показатель	Контроль, n=50	Пациенты на 5 сутки, n=93	Пациенты на 30 сутки, n=95
NO (мкмоль/л)	4,10 [4,00; 4,20]	2,15 [2,00; 2,30] p<0,0001	1,52 [1,40; 1,70] p<0,0001 p <sub>1</sub> =0,037276
ADMA (ng/ml)	181,49 [150,65; 205,45]	40,94 [30,02; 48,46] p=0,001420	85,98 [69,39; 95,81] p=0,050953 p <sub>1</sub> =0,197047
ЦЭК, ×10 <sup>4</sup> /л	2,15 2,00; 2,30]	13,10 [12,30; 14,00] p<0,0001	4,54 [4,20; 4,90] p<0,0001 p <sub>1</sub> <0,0001

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно предыдущего периода.

## **5.2. Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК у пострадавших в зависимости от уровня повреждения тканей**

У пострадавших с отморожением дистальных сегментов стоп содержание NO в крови уменьшилась в 1,7 раза (p<0,0001) относительно контроля. У больных с поражением более проксимальных сегментов нижних конечностей показатель NO снизился в 2,3 раза (p<0,0001) относительно здоровых добровольцев. У пациентов с самыми тяжелыми отморожениями нижних конечностей уровень NO в крови снизился в 2,9 раза (p<0,0001) (Таблица 16) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2021].

**Таблица 16** - Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК в крови пострадавших в зависимости от уровня поражения (Ме [Q1; Q3])

Показатель	Контроль, n=50	1 группа, n= 71	2 группа, n= 73	3 группа, n= 69
NO (мкмоль/л)	4,10 [4,00; 4,20]	2,21 [2,10; 2,33] p<0,0001	1,83 [1,80; 1,90] p<0,0001 p <sub>1</sub> =0,100444	1,47 [1,40; 1,50] p<0,0001 p <sub>1</sub> =0,000640 p <sub>2</sub> =0,040432
ADMA (ng/ml)	181,49 [150,65; 205,45]	169,63 [165,05; 178,28] p=0,780429	109,76 [100,36; 114,48] p=0,081133 p <sub>1</sub> =0,011851	50,10 [37,90; 56,59] p=0,002607 p <sub>1</sub> <0,0001 p <sub>2</sub> =0,006199
ЦЭК, ×10 <sup>4</sup> /л	2,15 [2,00; 2,30]	6,35 [6,00; 6,73] p<0,0001	14,69 [14,00; 15,00] p<0,0001 p <sub>1</sub> <0,0001	19,88 [18,40; 20,60] p<0,0001 p <sub>1</sub> <0,0001 p <sub>2</sub> =0,066425

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно 1 группы;

p<sub>2</sub> – достоверность разницы показателей относительно 2 группы.

У пострадавших с отморожением дистальных сегментов стоп уровень в крови ADMA не отклонялся относительно контроля. У больных с поражением более проксимальных сегментов нижних конечностей показатель ADMA статистически не отличался (p=0,08) относительно здоровых добровольцев. У пациентов с самыми тяжелыми отморожениями нижних конечностей уровень ADMA в крови снижался в 3,6 раза (p=0,002) (Таблица 16). У пострадавших с отморожением дистальных сегментов стоп содержание ЦЭК в крови увеличилось в 2,7 раза (p<0,0001) относительно контроля. У больных с поражением более проксимальных сегментов нижних конечностей показатель ЦЭК увеличивался в 6,7 раза (p<0,0001) относительно здоровых добровольцев. У пациентов с самыми тяжелыми отморожениями нижних конечностей уровень ЦЭК в крови повышался в 9 раз (p<0,0001) (Таблица 16) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2021].

Увеличение объема поврежденных тканей провоцирует значительное повреждение сосудистой стенки, гибель эндотелиоцитов и обнажение субэндотелиального матрикса. В ответ на это активируется все большее количество тромбоцитов, которые реализуют процессы воспаления и привлекают в очаг альтерации иммунокомпетентные клетки. Тромбоциты выделяют тромбоксан А<sub>2</sub>, являющийся мощнейшим вазоконстриктором. Процессы периферического вазоспазма еще больше усугубляются. Снижение в крови уровня ADMA у пациентов с выраженной площадью альтерации, вероятно, опять-таки может являться механизмом стабилизации периферического вазоспазма и усугубляющейся ишемии путем попытки косвенной провокации синтеза оксида азота, хотя его уровень снижен во все периоды криоповреждения.

### **5.3. Значимость показателей асимметричного диметиларгинина, оксида азота и циркулирующих эндотелиальных клеток в структуре прогностической модели уровня повреждения тканей при отморожении**

Гипотетически существует вероятность увеличения эффективности диагностики уровня криоповреждения при одновременном учете нескольких показателей.

В связи с этим, вторым этапом исследования явилось создание и оценка эффективности прогностической модели. С целью прогнозирования объема криоповреждения разработан коэффициент К, расчет которого основан на нелинейном регрессионном анализе и выражается формулой:  $K = 100 \times \text{ЦЭК} / (\text{ADMA} \times \text{NO})$ , где ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки, ADMA – асимметричный диметиларгинин, NO – оксид азота. При значениях коэффициента К от 1,0 до 5,0 прогнозируется деструкция на уровне пальцев, от 5,0 до 13,0 – на уровне дистального сегмента стопы, более 13,0 – на уровне нижней трети голени. Коэффициент корреляции между объемом поражения тканей нижних конечностей и значением коэффициента К составляет 0,963. Связь между исследуемыми признаками - прямая, теснота (сила) связи по шкале Чеддока – высокая. Учитывая

результаты статистического анализа, можно считать разработанную модель близкой к функциональной (Таблица 17).

**Таблица 17** - Определение множественного коэффициента детерминации полученной модели прогнозирования уровня поражения тканей при отморожении

Модель	R	R <sup>2</sup>	Скорректированный R <sup>2</sup>	Стандартная ошибка оценки
$K = 100 \times \text{ЦЭК} / (\text{ADMA} \times \text{NO})$	0,988	0,975	0,975	0,165

Сформированная модель позволяет с высокой точностью прогнозировать уровень повреждения тканей при местной холодовой травме на основе исследуемых маркеров, что, вне всякого сомнения, имеет важное прикладное значение и способствует коррекции проводимого лечения в зависимости от полученных результатов.

#### **5.4. Сывороточный кальпротектин и феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при криповреждении**

В настоящее время кальпротектин потенцируется как маркер при многих аутоиммунных и воспалительных патологиях. Получены данные, подтверждающие важную роль MRP8/14 при артрите, ожирении, сахарном диабете 2-го типа, сердечно-сосудистых катастрофах и ряде других заболеваний [М. Корес-Medrek et al., 2016; F. Ometto et al., 2017]. Однако, в современной литературе отсутствуют исследования данного биомаркера у пациентов с отморожениями.

Недавние исследования показали, что повышенные уровни воспалительных маркеров, например, высокочувствительного С-реактивного белка (hs-CRP) и интерлейкина-6 (IL-6), могут модифицировать агрегацию тромбоцитов и снижать эффективность антиагрегантов [Б.И. Кузник и др., 2014]. Однако влияние уровней кальпротектина на агрегацию тромбоцитов у пациентов с местной холодовой травмой не исследовалось.

Особую роль в понимании патогенеза многих заболеваний занимают межклеточные взаимодействия, в частности, феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной коагрегации, описанный Б.И. Кузником, Ю.А. Витковским и А.В. Солповым (2014). Авторами показано, что все форменные элементы крови способны взаимодействовать между собой. В частности, все виды лейкоцитов способны агрегировать с тромбоцитами. Появление агрегатов не только может приводить к нарушению микроциркуляции, но и способствовать повреждению сосудистой стенки, развитию эндотелиальной дисфункции. Требуется дальнейшее исследование механизмов регуляции лимфоцитарно-тромбоцитарной кооперации при местной холодовой травме.

**Таблица 18** - Содержание кальпротектина в сыворотке крови и лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у пострадавших с местной холодовой травмой в разные периоды криповреждения (Me [Q1; Q3])

Исследуемые группы	L1-протеин (ng/ml)	Процент ЛТА	Степень ЛТА
Контроль, n = 50	184,69 [174,42; 217,53]	14,00 [12,92; 14,53]	2,03 [1,99; 2,02]
Пациенты на 5 сутки, n=93	870,45 [858,57; 924,49] p = 0,001	18,03 [14,89; 19,22] p = 0,021	2,97 [2,59; 3,43] p = 0,018
Пациенты на 30 сутки, n=95	864,59 [802,88; 997,59] p = 0,001 p <sub>1</sub> = 0,752	17,21 [16,59; 17,89] p = 0,019 p <sub>1</sub> = 0,6	3,41 [2,92; 3,82] p = 0,015 p <sub>1</sub> = 0,46

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно значений на 5-е сутки с момента криповреждения.

В позднем реактивном периоде у пострадавших с местной холодовой травмой уровень кальпротектина в сыворотке крови в 4,6 раза выше относительно группы контроля (p = 0,001), на 30 сутки криповреждения – значение кальпротектина в 4,5 раза превосходило контрольные показатели (p = 0,001) (Таблица 18).

У пациентов в позднем реактивном периоде криповреждения процент ЛТА относительно контроля повышался в 1,3 раза (p = 0,021), при этом степень адгезии

возрастала в 1,5 раза ( $p = 0,018$ ). В периоде гранулирования и эпителизации у пострадавших с криотравмой процент адгезии относительно контроля больше в 1,2 раза ( $p = 0,019$ ), а степень адгезии – в 1,7 раза ( $p = 0,015$ ) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2020].

**Таблица 19** - Содержание сывороточного кальпротектина и лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у пострадавших с местной холодовой травмой в зависимости от объема пораженных тканей (Me [Q1; Q3])

Исследуемые группы	L1-протеин (ng/ml)	Процент ЛТА	Степень ЛТА
Контроль, n = 50	184,69 [174,42; 217,53]	14,0 [12,92; 14,53]	2,03 [1,99; 2,02]
1 группа, n = 71	448,75 [419,53; 471,99] $p < 0,0001$	18,03 [14,89; 19,22] $p = 0,021$	2,97 [2,59; 3,43] $p = 0,018$
2 группа, n = 73	643,45 [601,18; 665,84] $p < 0,0001$ $p_1 < 0,0001$	22,01 [20,41; 23,62] $p < 0,001$ $p_1 = 0,019$	4,19 [3,69; 4,41] $p < 0,001$ $p_1 = 0,015$
3 группа, n = 69	870,45 [858,57; 924,49] $p < 0,0001$ $p_1 < 0,0001$ $p_2 < 0,0001$	41,02 [37,7; 46,2] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	7,41 [6,68; 8,13] $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

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 пациентов с криотравмой пальцев процент лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии увеличивался в 1,3 раза ( $p = 0,021$ ), при этом степень адгезии возрастала в 1,5 раза ( $p = 0,018$ ) (Таблица 19).

У пострадавших с более тяжелыми поражениями адгезивность тромбоцитов к лимфоцитам увеличивалась в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ). Если сравнить результаты коагрегации пациентов с минимальным объемом поврежденных холодом тканей, процент коагрегации возрастал в 1,2 раза ( $p_1 = 0,019$ ), а степень - в 1,4 раза ( $p_1 = 0,015$ ) (Таблица 19).

При максимальном поражении тканей холодом адгезивность лейкоцитов к кровяным пластинкам возрастала в 3 раза ( $p < 0,001$ ), степень адгезии увеличивалась в 3,5 раза ( $p < 0,001$ ). У пострадавших с минимальным поражением процент ЛТА повышался в 2,3 раза ( $p_1 < 0,001$ ), при этом среднее число пластинок,

участвовавших в розеткообразовании, возрастало в 2,3 раза ( $p_1 < 0,001$ ). По сравнению с показателями пострадавших второй группы адгезивность форменных элементов возрастала в 1,8 раза ( $p_2 < 0,001$ ), а степень адгезии увеличивалась в 1,7 раза ( $p_2 < 0,001$ ) (Таблица 19) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2020].

Таким образом, у пациентов с местной холодовой травмой отмечено резкое повышение уровня сывороточного кальпротектина и лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов во всех исследуемых группах и в динамике. Неблагоприятным фактором является то, что в крови определяются коагрегаты с 4-6 тромбоцитами, которые, вне всякого сомнения, усугубляют ишемию тканей зоны повреждения и создает неблагоприятные предпосылки для возникновения осложнений в постальтерационный период криотравмы.

## **ГЛАВА 6. Молекулы межклеточной адгезии и асимметричный диметиларгинин у пациентов с отморожениями**

Комплексное исследование изменений уровня инкреторной активности эндотелия, а также содержание экспрессируемых на его поверхности белков перспективны и актуальны, что объясняется их прогностическим значением в диагностике и оценке местной холодовой травмы. Тем не менее, работы по данной тематике в литературе практически не представлены.

### **6.1. Динамика концентрации молекул межклеточной адгезии и уровня асимметричного диметиларгинина у пострадавших в разные периоды криотравмы**

У пациентов с местной холодовой травмой на 5 сутки в сыворотке крови по сравнению с группой контроля значительно повысились концентрации CD40L в 14,8 раз ( $p=0,001$ ), sE-Sel в 7,6 раза ( $p=0,009$ ), sP-Sel в 13,6 раза ( $p=0,003$ ), ICAM-1 в 22,6 раза ( $p<0,0001$ ), VCAM-1 в 1,9 раза ( $p=0,111$ ), и при этом снизился уровень ADMA в 4,5 раза ( $p=0,001$ ) (Таблица 20).

На 30-е сутки с момента отморожения величины большинства адгезивных молекул оставались значительно выше контрольных значений: значения CD40L превышали в 12,7 раза ( $p=0,009$ ), уровень sE-Sel – в 7,6 раза ( $p=0,012$ ), количество sP-Sel – в 15,3 раза ( $p=0,001$ ), содержание ICAM-1 – в 6,3 раза ( $p=0,015$ ). Однако концентрация VCAM-1 не отличалась от контроля, а уровень ADMA уменьшился в 2,1 раза ( $p=0,051$ ) относительно контрольных значений (Таблица 20) [М.И. Михайличенко и др., 2021].

Максимальное содержание адгезивных молекул у пострадавших наблюдается на 5 сутки и у пациентов с самыми тяжелыми отморожениями. На 30 сутки уровень исследуемых параметров превышает значения контроля. 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 [Б.И. Кузник и соавт., 2014; Н. Läubli et al., 2019; К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].

**Таблица 20** - Содержание молекул межклеточной адгезии и ADMA в сыворотке крови у пострадавших в разные периоды криоповреждения (ME [Q1; Q3])

Показатель	Контроль, n=50	Пациенты на 5 сутки, n=93	Пациенты на 30 сутки, n=95
CD40L (ng/ml)	244,34 [210,10; 289,85]	3621,27 [3031,00; 3903,75] $p_1=0,001^*$	3118,34 [2401,00; 3827,00] $p_1=0,009^*$ $p_2=0,729$
sE-Sel (ng/ml)	45,10 [41,88; 49,75]	345,29 [265,00; 400,70] $p_1=0,009^*$	342,23 [267,75; 382,20] $p_1=0,012^*$ $p_2=0,985$
sP-Sel (ng/ml)	131,93 [105,63; 140,88]	1784,82 [1450,50; 2068,13] $p_1=0,003^*$	2008,06 [1661,50; 2336,00] $p_1=0,0007^*$ $p_2=0,768$
ICAM-1 (ng/ml)	2,36 [1,70; 2,91]	55,15 [51,6; 62,24] $p_1<0,0001$	15,28 [11,68; 28,87] $p_1=0,015^*$ $p_2=0,0002^*$
VCAM-1 (ng/ml)	45,06 [37,56; 47,50]	85,74 [76,02; 94,74] $p_1=0,111$	57,27 [44,58; 65,26] $p_1=0,632$ $p_2=0,303$
ADMA (ng/ml)	181,49 [150,65; 205,45]	40,94 [30,02; 48,46] $p_1=0,001^*$	85,98 [69,39; 95,81] $p_1=0,051$ $p_2=0,198$

Примечание:

$p_1$  – достоверность разницы показателей относительно контроля;

$p_2$  – достоверность разницы показателей относительно групп исследования;

\* - наличие статистически значимых различий.

Сниженный уровень ADMA, вероятно, связан с включающимися механизмами стабилизации после альтерации и попытками организма способствовать эндотелий-зависимой вазодилатации путем ингибирования инкреции одного из внутриклеточных супрессоров оксида азота. Данный факт опровергает общепринятое мнение об основополагающей роли гиперсекреции ADMA в

реализации эндотелий-зависимой вазоконстрикции [М. В. Landim et al., 2009; О.Е. Анциферова и соавт., 2018; С. Zoccali et al., 2001; О. Suda et al., 2014].

## **6.2. Динамика концентрации молекул межклеточной адгезии и уровня асимметричного диметиларгинина при различной тяжести местной холодовой травмы**

При исследовании изучаемых показателей у пострадавших в зависимости от масштаба криповреждения было выявлено, что у пострадавших с отморожением дистальных сегментов стоп зафиксировано увеличение концентрации в крови большинства исследуемых маркеров. Так уровень CD40L увеличился в 2,8 раза ( $p=0,002$ ), значение sE-Sel - в 4 раза ( $p=0,03$ ), показатель sP-Sel - в 4,8 раза ( $p<0,0001$ ), уровень ICAM-1 и значение VCAM-1 не изменились относительно контроля (Таблица 21) [М.И. Михайличенко и др., 2021].

У больных с поражением всей стопы уровень CD40L в урочи увеличился в 7,1 раза ( $p<0,0001$ ), значение sE-Sel - в 5 раз ( $p<0,0001$ ), показатель sP-Sel - в 14,2 раза ( $p<0,0001$ ), уровень ICAM-1 - в 2,9 раза ( $p=0,02$ ), значение VCAM-1 и уровень ADMA не изменились относительно контроля (Таблица 21) [М.И. Михайличенко и др., 2021].

У пациентов с криповреждением до уровня нижней трети голени уровень CD40L в системном кровотоке увеличился в 15,3 раза ( $p<0,0001$ ), значение sE-Sel - в 8,4 раза ( $p<0,0001$ ), показатель sP-Sel - в 17,9 раз ( $p<0,0001$ ), уровень ICAM-1 - в 7,5 раз ( $p<0,0001$ ), значение VCAM-1 - в 2,4 раза ( $p=0,005$ ), а уровень ADMA снизился в 3,6 раза ( $p=0,006$ ) (Таблица 21) [М.И. Михайличенко и др., 2021].

Несмотря на выявленную высокую корреляционную связь (см. главу 9) между уровнем криповреждения, содержанием молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина, при проведении корреляционного анализа не выявлено зависимостей близких по значению к абсолютной функциональной связи. Поэтому решено выполнить регрессионный анализ.

**Таблица 21** - Содержание молекул межклеточной адгезии и ADMA в сыворотке крови у пострадавших с местной холодовой травмой в зависимости от объема пораженных тканей (ME [Q1; Q3])

Показатель	Контроль, n=50	1 группа, n=71	2 группа, n=73	3 группа, n=69
CD40L (ng/ml)	244,34 [210,10; 289,85]	690,92 [601,78; 787,63] p <sub>1</sub> =0,002*	1731,01 [1640,25; 1820,90] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> <0,0001*	3741,41 [3304,00; 3911,50] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> <0,0001* p <sub>3</sub> =0,015*
sE-Sel (ng/ml)	45,10 [41,88; 49,75]	182,67 [138,03; 210,80] p <sub>1</sub> =0,03*	228,54 [205,63; 257,60] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> =0,529	379,84 [320,35; 390,25] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> =0,124 p <sub>3</sub> =0,2
sP-Sel (ng/ml)	131,93 [105,63; 140,88]	635,11 [600,00; 700,95] p <sub>1</sub> <0,0001*	1865,54 [1580,50; 2119,38] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> =0,001*	2359,30 [2068,88; 2614,00] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> <0,0001* p <sub>3</sub> =0,318
ICAM-1 (ng/ml)	2,36 [1,70; 2,91]	5,28 [4,48; 6,33] p <sub>1</sub> =0,11	7,18 [6,12; 7,80] p <sub>1</sub> =0,02* p <sub>2</sub> =0,453	15,16 [12,61; 5,86] p <sub>1</sub> <0,0001* p <sub>2</sub> =0,005* p <sub>3</sub> =0,025*
VCAM-1 (ng/ml)	45,06 [37,56; 47,50]	48,51 [33,09; 64,51] p <sub>1</sub> =0,903	85,91 [79,23; 92,18] p <sub>1</sub> =0,05 p <sub>2</sub> =0,16	109,75 [99,64; 120,08] p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,031* p <sub>3</sub> =0,236
ADMA (ng/ml)	181,49 [150,65; 205,45]	161,42 [164,23; 177,58] p <sub>1</sub> =0,71	108,74 [100,09; 113,48] p <sub>1</sub> =0,076 p <sub>2</sub> =0,198	54,21 [38,40; 59,90] p <sub>1</sub> =0,006* p <sub>2</sub> =0,019* p <sub>3</sub> =0,045*

Примечание:

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>2</sub> – достоверность разницы показателей относительно 1 группы больных;

p<sub>3</sub> – достоверность разницы показателей относительно 2 группы больных;

\* - наличие статистически значимых различий.

На основании анализа уравнения линейной регрессии, в которое были включены исходные показатели, определена значимость показателей в структуре модели прогнозирования уровня повреждения тканей при отморожении (Таблица 22).

**Таблица 22** - Значимость показателей молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгенина в структуре модели прогнозирования уровня повреждения тканей при отморожении (Me [Q1; Q3])

Модель	Нестандартизованные коэффициенты		Стандартизованные коэффициенты		Значимость в структуре модели
	B	Стандартная ошибка	Бета	t	
Константа	0,582	0,212		2,752	<b>0,007</b>
CD40L	0,0001	0,0001	0,218	4,226	<b>0,0001</b>
sE-Sel	0,001	0,0001	0,180	5,212	<b>0,0001</b>
sP-Sel	0,001	0,0001	0,436	9,405	<b>0,0001</b>
ICAM-1	0,017	0,009	0,080	1,831	0,07
VCAM-1	0,0001	0,001	-0,004	-0,108	0,914
ADMA	-0,003	0,001	-0,147	-2,809	<b>0,006</b>

Учитывая недостаточную значимость, показатели ICAM-1 и VCAM-1 удалены из структуры исходной модели. В результате чего путем повторной линейной регрессии определена закономерность, выражающаяся формулой:  $K = 0,7 + 0,0001 \times CD40L + 0,002 \times sE-Sel + 0,001 \times sP-Sel - 0,003 \times ADMA$ , наименование единиц измерения показателей - ng/ml. При значениях K от 1,0 до 2,0 диагностируют отморожение пальцев стоп, при K от 2,0 до 3,4 граница поражения распространялась до предплюсно-плюсневого сочленения, более 3,4 – до уровня нижней трети голени (Таблица 23).

**Таблица 23** - Определение множественного коэффициента детерминации полученной модели прогнозирования уровня поражения тканей при отморожении

Модель	R	R <sup>2</sup>	Скорректированный R <sup>2</sup>	Стандартная ошибка оценки
$K = 0,7 + 0,0001 \times CD40L + 0,002 \times sE-Sel + 0,001 \times sP-Sel - 0,003 \times ADMA$	0,975	0,951	0,949	0,23

Учитывая значение скорректированного коэффициента детерминации (0,949), можно считать зависимость между коэффициентом K и уровнем поражения дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме близкой к функциональной.

На основании полученных данных созданы программы в среде разработки Delphi и App Inventor, которые дают возможность проводить упрощенный расчет предложенного коэффициента (Рисунок 7).

Программа для ранней диагностики уровня поражений дистальных сегментов нижних конечностей при местной ... X

**Введите значения уровня молекул межклеточной адгезии и ADMA**

CD40L	<input type="text" value="1730"/>	ng/ml
sE-Sel	<input type="text" value="230"/>	ng/ml
sP-Sel	<input type="text" value="1865"/>	ng/ml
ADMA	<input type="text" value="108"/>	ng/ml

Условные сокращения

CD40L - кадгерин CD40L;  
sE-Sel - sE-селектин;



**Оценить**

**Результат**

Отморожение на уровне дистального сегмента стопы

**Очистить**

**Выход**

**Рисунок 7** - Пример ранней диагностики уровня поражения дистальных сегментов нижних конечностей с помощью разработанного приложения

Данный сервис возможен для пользователей Windows (персональный компьютер) и Android (смартфон, планшет).

Комплексный анализ концентрации молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина является надежным методом выявления эндотелиальной дисфункции [F. Lotrich, 2012; S. Moncada et al., 2012; V. P. Valkonen et al., 2001; V. Achan et al., 2003], а также ранней диагностики уровня поражения дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме, что позволяет сформировать представления о процессе восстановления в динамике.

## **ГЛАВА 7. Биомаркеры клеточных повреждений и цитодегенеративные процессы при криотравме**

### **7.1. Содержание миелопероксидазы у пациентов с местной холодовой травмой**

Поврежденный холодовым фактором и продуктами вторичной альтерации эндотелий, а также иммунокомпетентные клетки инкретируют огромное количество биологически активных субстанций [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Необходимо отметить, что работы, описывающие феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА), указывают на биологическую целесообразность миграции клеточных коагрегатов в межучточное пространство для реализации процессов воспаления и создания фундамента для стабилизации клеточных структур [Б.И Кузник и соавт., 2014]. Однако некоторая группа биологически активных веществ, выделяемых лейкоцитами, провоцирует выраженное повреждение тканевых структур. К ним, в частности, относятся миелопероксидаза (МРО) и сывороточный кальпротектин (L-протеин) [I. Rashid et al., 2018; B. Shao et al., 2010; B. Zhou et al., 2017; S. Nicholls et al., 2005; E. V. Shamova et al., 2019].

**Таблица 24** - Содержание миелопероксидазы и L-протеина в крови пациентов с местной холодовой травмой (МЕ [Q1; Q3])

	Контроль, (n = 50)	Пациенты на 5 сутки, n=93	Пациенты на 30 сутки, n=95
МРО (ng/ml)	161 [119; 198]	1154 [760; 1458] (p=0,03)	578 [513; 650] (p=0,01) (p <sub>1</sub> =0,23)
L1-протеин (ng/ml)	185 [151; 208]	864 [701; 980] (p=0,001)	865 [770; 1008] p=0,001 p <sub>1</sub> =0,75

Примечание:

p – статистическая значимость разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – статистическая значимость разницы показателей относительно групп исследования.

Выявлено повышение уровня МРО у пациентов с криотравмой относительно группы контроля в позднем реактивном периоде. В то же время, у пациентов в периоде гранулирования и эпителизации уровень миелопероксидазы снизился по сравнению с показателями содержания МРО в сыворотке у пациентов на 5 сутки, однако оставался выше уровня здоровых людей (Таблица 24) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2020].

В позднем реактивном периоде у пациентов с местной холодовой травмой уровень миелопероксидазы в 7,3 раза выше относительно контроля (p=0,03), на 30 сутки – значение МРО остается повышенным в 3,6 раза (p=0,01) (Таблица 24) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2020].

В ходе исследований установлено, что уровень кальпротектина сыворотки крови увеличился относительно группы контроля во все периоды криоповреждения.

В позднем реактивном периоде у пострадавших с местной холодовой травмой уровень кальпротектина в сыворотке крови в 4,6 раза выше относительно группы контроля (p = 0,001), на 30 сутки криоповреждения – значение кальпротектина в 4,5 раза превосходило контрольные показатели (p = 0,001) (Таблица 24).

Таким образом, у пострадавших отмечается повышение содержания миелопероксидазы и L-протеина в сыворотке крови во все периоды течения глубоких отморожений, соответственно динамике раневого процесса.

Миелопероксидаза является членом надсемейства гем-пероксидаз, в основном экспрессируется в нейтрофилах и моноцитах. Повышение уровня МРО в циркулирующей крови связано с воспалением и повышенным окислительным стрессом [I. Rashid et al., 2018; B. Shao et al., 2010; B. Zhou et al., 2017; S. Nicholls et al., 2005]. Возрастание уровня МРО в настоящее время трактуется как маркер плохого прогноза и неблагоприятного течения раневого процесса [I. Rashid et al., 2018].

## **7.2. Уровень периферического нейрофиламента у больных с криповреждением**

Малоинвазивные методики оценки состояния тканей представляются перспективными в прогнозировании отдаленных результатов местной холодовой травмы, а лабораторные данные периферической нейродеструкции, в частности, уровень фосфорилированного нейрофиламента Н (pNF-H), позволяют комплексно оценить объем аксонального повреждения у пострадавших [Т.А. Яхьяева, 2020].

Учитывая, что в норме нейрофиламенты располагаются только в аксонах нейронов, их выявление с помощью антител является перспективным в изучении патологии периферической иннервации при различной патологии, в том числе и при криповреждении [B. Pourheydar et al., 2020]. Показано, что периферический нейрофиламент Н служит маркером нейронов, образующих А-волокна (субпопуляция проприоцептивных и тактильных средних нейронов). Однако, необходимо отметить, что нейрофиламенты также экспрессируются и такими высокодифференцированными клетками, как клетки Сертоли и Лейдига [B. Pourheydar et al., 2020].



**Таблица 25** - Показатели pNF-H у пациентов с местной холодовой травмой (ME [Q1; Q3])

Показатели	pNF-H (ng/ml)
Контроль, n=50	57,46 [42,0; 73,14]
Пациенты на 5 сутки, n=93	815,7 [546,3; 1085,7] (p<0,001)
Пациенты на 30 сутки, n=95	573,01 [402,1; 637,05] (p<0,001) (p <sub>1</sub> <0,001)

Примечание:

p – достоверность разницы показателей относительно контроля;

p<sub>1</sub> – достоверность разницы показателей относительно больных с отморожениями в позднем реактивном периоде.

В позднем реактивном периоде в исследуемой группе уровень pNF-H в крови повышался в 14,5 раз относительно показателей контроля (p<0,001) (Таблица 25). Подобное явление связано как со стойкой периферической нейродеструкцией, продолжающемся повреждением тканей, так и с истощением активных механизмов регуляции тонуса, рефрактерности гладкой мускулатуры сосудистой стенки. В периоде гранулирования и эпителизации отмечено снижение уровня pNF-H в 1,5 раза по сравнению с поздним реактивным периодом (p<0,01), но значение по-прежнему остается выше показателей контроля. Подобный факт можно объяснить наличием участка патологической нервной импульсации и продолжающейся нейродеструкцией, наряду с восстановлением нервной ткани [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2020].

При анализе полученных данных обращает на себя внимание выраженное снижение биоэлектрической активности мышц в разные периоды криоповреждения и резкое повышение уровня периферического нейрофиламента относительно группы контроля. Этот факт доказывает патогенетическую обоснованность выделения периодов криоповреждения, а также затяжное течение раневого процесса у большинства пострадавших. В поздние сроки травмы биоэлектрическая активность мышц (БЭА) имела тенденцию к восстановлению, а уровень pNF-H оставался значительно выше контроля.

Подобная динамика соответствует общепринятым понятиям о течение раневого процесса при криповреждении и указывает на стойкую периферическую нейропатию [L.A. Zilliox, 2017].

Выявленное снижение биоэлектрической активности мышц напрямую связано с резким повышением уровня периферического нейрофиламента Н. Происходящая выраженная аксональная дегенерация нашла свое отражение в снижении скорости распространения возбуждения, амплитуды М-ответа и резидуальной латентности.

## ГЛАВА 8. Корреляционные взаимосвязи уровня маркеров состояния эндотелия, периферической нервной системы и репарации при местной холодовой травме

Обнаружено, что у больных с отморожениями концентрация в крови коллагеназ и их ингибиторов коррелируют с уровнем поражения нижних конечностей. У пациентов с местной холодовой травмой выявлена прямая сильная связь по шкале Чеддока между уровнем матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов и уровнем поражения тканей ( $r=0,797$ ;  $r=0,907$ ,  $p<0,001$ ) (Таблица 26). Вероятно, это связано с ремоделированием цитоскелета, репарацией тканей, ангиогенеза. При этом имеются предпосылки к нетипичному, затяжному течению репаративных процессов.

**Таблица 26** - Взаимосвязь активности матриксных металлопротеиназ с уровнем поражения нижних конечностей

Параметры	Коэффициент корреляции Спирмена	Статистическая значимость	Сила связи по шкале Чеддока
ММР-2	0,797	< 0,001	Высокая прямая
ММР-9	0,907	< 0,001	Высокая прямая
ТИМР-1	- 0,186	0,002	Слабая обратная
ТИМР-2	0,381	< 0,001	Умеренная прямая

**Таблица 27** - Взаимосвязь содержания кальпротектина, активности лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии с уровнем поражения нижних конечностей

Параметры	Коэффициент корреляции Спирмена	Статистическая значимость	Сила связи по шкале Чеддока
Содержание кальпротектина	0,838	< 0,0001	Высокая прямая
Процент ЛТА	0,862	< 0,0001	Высокая прямая
Степень ЛТА	0,929	< 0,0001	Высокая прямая

Выявлено, что уровень кальпротектина, процент лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и ее степень коррелируют с тяжестью холодовой травмы ( $r=0,838$ ,  $r=862$ ,  $r=929$ ,  $p<0,0001$ ) (Таблица 27). Повышенный уровень кальпротектина, инкретируемого лейкоцитами, является активатором межклеточных взаимодействий, что нашло свое отражение в реализации лимфоцитарно-пластиночных взаимодействий. Лимфоцитарно-тромбоцитарные кластеры создают фундамент для процессов репарации и миграции иммунокомпетентных клеток в межклеточное пространство. Однако, повышение содержания сывороточного кальпротектина и формирование коагрегатов провоцируют закупорку микроциркуляторного русла, что усугубляет альтерацию в зоне паранекроза.

**Таблица 28** - Взаимосвязь содержания адгезивных молекул, асимметричного диметиларгинина с уровнем поражения нижних конечностей

Параметры	Коэффициент корреляции Спирмена	Статистическая значимость	Сила связи по шкале Чеддока
CD40L	0,962	<0,001	Высокая прямая
sE-Sele	0,866	<0,001	Высокая прямая
sP-Sele	0,913	<0,001	Высокая прямая
ICAM -1	0,886	<0,001	Высокая прямая
VCAM –1	0,837	<0,001	Высокая прямая
ADMA	-0,898	<0,001	Высокая обратная

Между уровнем молекул межклеточной адгезии и уровнем криповреждения наблюдалась прямая высокая корреляционная связь, а уровнем асимметричного диметиларгинина – обратная высокая корреляционная связь (Таблица 28). Известно, что молекулы адгезии в условиях физиологии практически отсутствуют на поверхности эндотелия. Нарушением скоростных показателей кровотока и повреждение субэндотелиального матрикса является одним из основных предикторов экспрессии молекул адгезии. Начальным этапом этого процесса выступают именно растворимые формы селектинов (sE-SEL, sP-SEL и суперсемейство CAM). Поврежденный эндотелий не в состоянии в полной мере реализовать выработку NO, как следствие, у пациентов с МХТ отмечается понижение уровня ADMA, который является основным антагонистом эндотелиального оксида азота.

**Таблица 29** - Взаимосвязь показателей электронейромиографии, периферического нейрофиламента - Н с периодом криоповреждения

Показатели	Коэффициент корреляции Спирмена	Статистическая значимость	Сила связи по шкале Чеддока
Амплитуда М-ответа	0,949	<0,001	Высокая прямая
Резидуальная латентность	- 0,947	<0,001	Высокая обратная
Скорость распространения возбуждения	0,95	<0,001	Высокая прямая
pNF-Н	- 0,843	0,004	Высокая обратная

Холодовая альтерация провоцирует повреждение, прежде всего, самых дифференцированных тканей - эндотелия и нервной, следовательно, проведение импульса по аксонально-дендритному контакту и распространение его по иннервируемым тканям нарушается, а зачастую и прекращается совсем. Этот факт нашел в корреляционных взаимодействиях у пациентов с местной холодовой травмой, показателями ЭНМГ и уровнем периферического нейрофиламента. У больных с отморожениями выявлена прямая высокая связь ( $r=0,949$ ,  $<0,001$ ) между амплитудой М-ответа и периодом криоповреждения; установлена высокая обратная связь ( $r=0,949$ ,  $<0,001$ ) между резидуальной латентностью и периодом местной холодовой травмы; выявлена высокая прямая связь ( $r=0,949$ ,  $<0,001$ ) между скоростью распространения возбуждения и периодом криотравмы; установлена высокая обратная связь ( $r=0,949$ ,  $<0,001$ ) (Таблица 29) между периодом криоповреждения и уровнем периферического нейрофиламента у пациентов с местной криотравмой. Формирующаяся периферическая нейропатия, вне всякого сомнения, представляет собой фундамент для затяжного и вялотекущего процесса воспаления. У большинства пациентов с местной холодовой травмой формируются трофические нарушения, остеомиелиты и гангрены поврежденного сегмента конечности при условии выполненной в срок и по показаниям некрэктомии.

## ГЛАВА 9. Классификация осложнений местной холодовой травмы

Существующие в настоящее время классификационные критерии отморожений основаны на этиологии, сроках и глубине холодового повреждения и не содержат признаков, определяющих наличие и характер ранних и поздних осложнений местной холодовой травмы, а также особенностей клинического течения и оперативного лечения последствий криповреждения [В.А. Сизоненко и соавт., 2003; Н. N. Turner et al., 2018; N. Patel et al., 2017; Т. L. Kiss et al., 2017; А. К. Lorentzen et al., 2018; А. К. Lorentzen et al., 2020]. Все более существенным аспектом становится справедливый расчет стоимости лечения пациентов в системе обязательного медицинского страхования. В связи с вышеизложенным, разработка новых способов классификации на основании этиопатогенетических механизмов формирования осложнений при местной холодовой травме является интересной как с теоретической, так и с организационно-экономической точки зрения.

В дифференциации местной холодовой травмы по локализации и уровню поражения использована классификация, предложенная В.А. Сизоненко (2003) (Таблица 30).

**Таблица 30** – Классификация отморожений

МЕСТНАЯ ХОЛОДОВАЯ ТРАВМА	
ПЕРИОДЫ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ	СТЕПЕНЬ (ГЛУБИНА) ПОРАЖЕНИЙ
I. Дореактивный	I. Микроскопическое (обратимое) поражение
II. Ранний реактивный	II. Поверхностное повреждение
III. Поздний реактивный	III. Некроз кожи и подкожножировой клетчатки
IV. Период гранулирования и эпителизации	IV. Повреждение всех слоев сегмента
V. Отдаленных последствий	

В ходе проведения проспективного исследования установлено, что у всех пациентов с местной холодовой травмой нижних конечностей (n=32, 100%) в пораженных сегментах конечностей выявлены нарушения чувствительности, мышечная слабость, судороги, нарушение координации движений. У 4 пациентов (12,5%) выявлено отторжение трансплантата, у 5 пациентов (15,5%) обнаружено нагноение и несостоятельность швов, у 2 (6,25%) пострадавших сформировался некроз культи (Таблица 31). Эти осложнения криотравмы мы отнесли к «ранним» (в течение 29 суток комплексного лечения). Выявленные стойкие поздние последствия местной холодовой травмы мы предлагаем обобщить в понятие «болезнь холодовой конечности» [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2021].



**Таблица 31** - Классификация осложнений местной холодовой травмы

РАННИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ МЕСТНОЙ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ, (n = 32)		ПОЗДНИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ МЕСТНОЙ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ, (n = 100)	
1. Нарушение чувствительности, мышечная слабость, судороги, нарушение координации движений	32 (100%)	1. Трофические язвы культей стоп	32 (32%)
2. Отторжение трансплантата	4 (12,5%)	2. Остеомиелит с формированием секвестров	28 (28%)
3. Нагноение и несостоятельность швов	5 (15,6%)	3. Гангрена стопы	12 (12%)
4. Некроз культя	2 (6,25%)		

**Ранние осложнения:** нагноение раны, некроз торца культя, несостоятельность швов, отторжение трансплантата (до периода отдаленных последствий);

**Поздние осложнения:** трофические язвы культей, остеомиелит с формированием секвестром, гангрена стопы, а также болезнь холодовой конечности и ее формы (нейропатическая, ишемическая, смешанная) (период отдаленных последствий криоповреждения).

Ретроспективно проанализированы поздние осложнения местной холодовой травмы (по истечении 30 суток комплексного лечения). Из 100 пациентов с местной холодовой травмой через 30 дней у 32 (32%) пострадавших обнаружены трофические язвы культей стоп, у 28 пациентов (28%) – остеомиелит с формированием секвестров, 12 пациентов (12%) обратились в стационар гангреной культей обеих стоп (Таблица 31) [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2021].

Выявленные осложнения указывают на неблагоприятный постморбидный фон у пострадавших с местной холодовой травмой. Эти осложнения мы связываем с тремя основными патофизиологическими составляющими местной холодовой травмы: хронической дисфункцией эндотелия, хронической нейропатией, комплексным нарушением кровотока в зоне перенесенной травмы.

В ходе объективного осмотра и инструментального исследования пациентов с последствиями местной холодовой травмы выявлены многочисленные изменения

как со стороны пораженных сегментов конечности, так и со стороны регионарной нейрососудистой системы (Таблица 32).

**Таблица 32** - Критерии форм холодовой конечности

Клинические факторы	Формы холодовой конечности			Статистическая значимость, df = 2
	Преимущественно нейропатическая форма	Преимущественно ишемическая форма	Смешанная форма	
Снижение чувствительности	100,0% (30/30)	9,4% (3/32)	100,0% (38/38)	$\chi^2=86,8$ , p<0,001
Судороги	86,7% (26/30)	12,5% (4/32)	86,9% (33/38)	$\chi^2=51,5$ , p<0,001
Нарушение координации движений	90,0% (27/30)	12,5% (4/32)	94,7% (36/38)	$\chi^2=63,4$ , p<0,001
Наличие трофических нарушений	93,3% (28/30)	31,3% (10/32)	94,7% (36/38)	$\chi^2=38,3$ , p<0,001
Вторичные признаки ишемизации конечности	3,3% (1/30)	93,8% (30/32)	94,7% (36/38)	$\chi^2=78,6$ , p<0,001
Отсутствие пульсации на магистральных сосудах	3,3% (1/30)	93,8% (30/32)	94,7% (36/38)	$\chi^2=78,6$ , p<0,001
УЗДГ-признаки нарушений кровотока	6,7% (2/30)	93,8% (30/32)	94,7% (36/38)	$\chi^2=74,1$ , p<0,001
ЭНМГ-признаки нарушений иннервации	93,3% (28/30)	6,3% (2/32)	92,1% (35/38)	$\chi^2=71,4$ , p<0,001

Установлено, что у пострадавших в подавляющем большинстве случаев определяются снижение чувствительности, мышечная слабость, судороги, нарушения движений. Эти явления связаны с нарушением иннервации пораженной конечности. После отморожений II степени развиваются невриты, нейроваскулиты, облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей и трофические нарушения дистальных сегментов стоп [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; C. R. Maguire et al., 2018; M. J. Hallam et al., 2010; A. Stjernbrandt et al., 2017; J. Lee, 2020]. Они с трудом поддаются лечению, а в послеоперационном периоде

при поражении III-IV степени часто отмечаются нагноения мягких тканей культи и вторичный некроз. Эти осложнения нередко ведут к сепсису, протяженным тромбозам и повторным операциям [S. E. McIntosh et al., 2014; K. McLeron, 2003]. При нарушениях чувствительной иннервации после отморожений неизбежно разобщение между потребностями тканей в трофике и оценке организмом этого процесса с вытекающими неблагоприятными последствиями. Нарушения симпатической иннервации – прямой путь к дистрофии тканей и образованию трофических нарушений, что так же отмечено у наших пациентов. Формируется нейропатическая форма холодовой конечности.

Частными осложнениями у пациентов с местной холодовой травмой являются нарушения регионарного кровотока, которые провоцируют формирование ишемической формы холодовой конечности (Таблица 28). У этих пациентов снижается магистральный кровоток на стопе и определяются вторичные признаки ишемического поражения кожи: отсутствие волосяного покрова, бледность кожи и ломкость ногтей. В случаях выраженного артериального дефицита возможны трофические нарушения и гангрена культи пораженной конечности (рисунок 16). В немногочисленных исследованиях, касающихся изучения микроциркуляции с помощью лазерной доплеровской флоуметрии у пациентов с местной холодовой травмой, показано, что комплексное нарушение кровотока в очаге альтерации и перифокально является важным звеном формирования осложнений местной холодовой травмы [A. M. Lacey et al., 2019; T. Masters et al., 2018; W. J. Mohr et al., 2009].

Довольно часто у пострадавших с криповреждением выявлялись признаки, свойственные и для поражения периферических нервов, и для дефицита регионарного кровоснабжения. Эти критерии сформировали отдельную смешанную форму холодовой конечности. Вероятно, подобное явление связано с комплексным поражением сосудисто-нервного пучка, а превалирование отдельных форм может объясняться преморбидными изменениями периферической нервной или, реже, сосудистой системы (Рисунок 8).

Для упрощения рубрикации осложнений выявленные изменения перенесенной местной холодовой травмы дополнительно сгруппированы с применением интегральной системы и внесены в Таблицу 33.



**Рисунок 8** - Трофические нарушения и гангрена культи пораженной конечности (последствия МХТ)

**Таблица 33** - Интегральная шкала определения форм холодовой конечности

КЛИНИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ	ФОРМЫ ХОЛОДОВОЙ КОНЕЧНОСТИ		
	ПРИЕМУЩЕСТВЕННО НЕЙРОПАТИЧЕСКАЯ ФОРМА	ПРИЕМУЩЕСТВЕННО ИШЕМИЧЕСКАЯ ФОРМА	СМЕШАННАЯ ФОРМА
Снижение чувствительности	+		+
Судороги	+		+
Нарушение координации движений	+		+
Наличие трофических нарушений	+	+	+
Вторичные признаки ишемизации конечности		+	+
Отсутствие пульсации на магистральных сосудах		+	+
УЗДГ-признаки нарушений кровотока		+	+
ЭНМГ-признаки нарушений иннервации	+		+
<b>Сумма баллов</b>	$\geq 3$	$\geq 3$	По 2 и более из нейропатической и ишемической форм

Выбранные критерии составляют подавляющее большинство возможных постальтерационных осложнений у пациентов с местной холодовой травмой (таблица 33). В настоящее время их использование в конкретных случаях необходимо ввиду своевременной коррекции «диагноз-ассоциированного» лечения, а также позволит более корректно и правильно уточнить экономическую составляющую терапии данной социально значимой проблемы.

Учитывая выше изложенное, предлагаемый способ классификации осложнений местной холодовой травмы имеет патогенетическое, методическое и организационно-экономическое значение, а также позволяет улучшить результаты оказания медицинской помощи пациентам с глубокими отморожениями [М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров, 2021].

## **ГЛАВА 10. Анализ комплексного лечения и прогнозирование уровня повреждения и осложнений при криотравме**

Местная холодовая травма сопровождается высоким уровнем инвалидности и, зачастую, неудовлетворительными результатами хирургического лечения, а также повторными операциями. Стандарт оказания медицинской помощи заключается в оптимизации кровообращения тканей на ранней стадии и органосохраняющей тактике в более поздние сроки [В.А. Сизоненко и соавт., 2003; К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; Ю.С. Винник и соавт., 2011; K. Hirose et al., 2019; J. Hu et al., 2016].

Систематизируя данные современных литературных источников и полученные в ходе исследования результаты, предпринята попытка прогнозирования развития послеоперационных осложнений отморожений и уровня повреждения тканей при местной холодовой травме.

Прогнозирование течения отморожений является одной из самых актуальных проблем в современной термической травме [С. Handford et al., 2017; Т. М. Ikkäheimo et al., 2011; С. Imray et al., 2009]. Известно, что в начальном периоде криотравмы определить уровень повреждения тканей не представляется возможным. Отсутствие демаркационной линии создает трудности в определении объема проводимой терапии и прогнозе дальнейшего течения повреждения [D. W. Jr. Hayes et al., 2000; P. Petrone et al., 2003; J. Viem et al., 2003]. В связи с этим частота неблагоприятного течения раневого процесса при местной холодовой травме достигает 35-40% [R. M. Nygaard et al., 2018; A. Poole et al., 2016]. Это связано с особенностями необходимого хирургического лечения, наличия регионарной эндотелиальной дисфункции с нарушением периферической иннервации, которые способствуют увеличению зоны паранекроза выше видимого повреждения. На первое место в структуре осложнений после операции выходит нагноение тканей и несостоятельность сформированной культи. Ранний прогноз позволяет выполнить коррекцию лечения, определить уровень поражения тканей, что способствует профилактике послеоперационных осложнений, значительно

сокращает сроки пребывания в стационаре и снижает процент инвалидизации [К.Г. Шаповалов, 2019; O. Henriksson et al., 2015; I. Reitan et al., 2019; Y. Pan et al., 2018].

У пациентов с прогнозируемым осложненным послеоперационным периодом и у пострадавших с поражением стопы и более проксимальных сегментов конечности на фоне стандартной схемы [А.А. Алексеев и соавт., 2017] лечения нами дополнительно проводились лечебные и профилактические мероприятия в соответствии с выявленными рисками с целью предотвращения развития осложнений.

Больным с риском возникновения осложненного послеоперационного периода дополнительно проводился курс введения реамбина с последующей амбулаторной сопроводительной антикоагулянтной терапией.

Базовыми исследованиями доказана ведущая роль янтарной кислоты как основного субстрата в адаптации [М. Jiang et al., 2017] и лечения неотложных состояний. Поэтому гипоксия и функциональная несостоятельность клеточных структур, выявленные у пациентов с отморожениями, являются основными патологическими процессами [К.Г. Шаповалов, 2019], которые являются мишенями для фармакологически корректирующих воздействий для стабилизации тяжелых патологических состояний и профилактики осложненного послеоперационного периода.

Стационарно в течение 7 дней с момента установления факта возможных осложнений после операции назначалась инфузия реамбина в объеме 800 мл в сутки по 60 капель в минуту внутривенно.

На амбулаторном этапе - препарат Прадакса® (дабигатрана этексилат) - перорально 110 мг два раза в сутки до еды.

Дабигатрана этексилат – представитель нового поколения пероральных антикоагулянтов / прямых ингибиторов тромбина, призванный заполнить пробелы в области профилактики и лечения острых и хронических заболеваний, связанных со стойкой гиперкоагуляцией [Т. Volek et al., 2019; K. D. Rainsford, 2009; L. R. Brandão et al., 2020].



В России препарат Прадакса® зарегистрирован для профилактики внутрисосудистых катастроф, тромбоэмболических осложнений, у пациентов перенесших массивные операции (регистрационное удостоверение ЛП 000872-181011).

Пациентам с риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений назначался продолжительный курс цефалоспоридами III поколения (5-7 дней после оперативного лечения) с сопровождающей эубиотической терапией.

Перед выпиской из стационара с пациентами проводились профилактические беседы и давались рекомендации о возможном развитии осложнений, а также строгом соблюдении лечебно-охранительного режима на амбулаторном этапе.

Для анализа повторных операций у пациентов в поздние сроки отможений выделено две группы пациентов: контрольная группа (n=40) пострадавших с назначенной стандартной терапией, и пациенты с применением методов прогнозирования осложнений и коррекцией проводимой терапии при выявлении риска неблагоприятного течения (n=60). Обнаружено, что у пострадавших контрольной группы осложнения выявлены у 98,2% (38/40), повторные операции – у 72% (32/40), средние сроки лечения составили  $32 \pm 3$  дня, инвалидизация – у 90% (36/40), отдаленные последствия обнаружены у 100% пострадавших. При этом при использовании прогностических моделей, построенных на основе данных ЭНМГ, и своевременной коррекции антикоагулянтной, дезагрегантной и антибактериальной терапии осложнения выявлены у 43,5% (27/60), повторные операции – у 25% (15/60), средние сроки лечения составили  $17 \pm 2$ , инвалидизация – у 60% (35/60), отдаленные последствия обнаружены у 52% (31/60) пострадавших (Таблица 34). При изучении лабораторных показателей у пациентов с прогнозируемым неблагоприятным течением послеоперационного периода с дополнением консервативной терапии инфузией реамбиринна по предложенной схеме выявлено, что процент ЛТА снизился в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), уровень МРО уменьшился в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ), количество циркулирующих

эндотелиальных клеток сократилось в 3,1 раза ( $p<0,05$ ), показатель периферического нейрофиламента снизился в 8,7 раза ( $p<0,05$ ) (Таблица 34).

**Таблица 34** - Результаты хирургического лечения отморожений

Параметр	Контрольная группа n=40	Группа пациентов, ведение которых осуществлялось с учетом прогнозирования n=60	Тестовая статистика	
Частота осложнений	98,2% (38/40)	43,5% (27/60)	$\chi^2=26,37$ , $p<0,001$	
Частота повторного оперативного лечения	72% (32/40)	25% (15/60)	$\chi^2=29,14$ , $p<0,001$	
Сроки стационарного лечения (дней)	32,0 [28,7; 34,2]	17,2 [15,3; 18,1]	U=549,0, $p<0,001$	
Частота инвалидизации	90% (36/40)	60% (35/60)	$\chi^2=11,69$ , $p<0,001$	
Отдаленные последствия	100% (40/40)	52% (31/60)	$\chi^2=27,23$ , $p<0,001$	
	Процент ЛТА	МРО (ng/ml)	ЦЭК, $\times 10^4$ /л	pNF-H (ng/ml)
Пациенты, с применением методов прогнозирования (n=60)	14,1 [13,2; 15,4]	250,3 [211,4; 269,6]	3,02 [2,8; 3,11]	121, 3 [97,1; 134,3]

Уровень пораженных тканей определяют согласно описанным ранее коэффициентом прогноза (К), сформированным на основании уравнения линейной регрессии с применением коэффициента детерминации. При значении К менее 2 прогнозируют отморожение на уровне пальцев стопы, при К от 2 до 3 – на уровне предплюсно-плюсневого сочленения, при К более 3 – тотальное поражение стопы.

### Клинические примеры

**Пример 1.** Пациентка С., 40 лет, поступила в Краевой ожоговый центр ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» 20.12.2017 г. с диагнозом: Отморожение обеих стоп III–IV степени, поздний реактивный период. Преморбидная патология не выражена, сопутствующих заболеваний нет.

20.12.17 г. пациентке до начала лечения при поступлении в стационар с помощью аппарата Нейро-ВМП, компании Нейрософт (г. Иваново) выполнена накожная стимуляционная электронейромиография обеих стоп импульсным переменным током в диапазоне 10-35 мА, продолжительностью 200-300 мС. Амплитуда М-ответа правой голени составила 0,43 мВ, левой голени – 0,46 мВ; резидуальная латентность правой голени – 7,2 мС, левой голени – 7,3 мС; скорость распространения возбуждения правой голени – 21 мС, левой голени – 23 мС.

Рассчитан коэффициент К для правой голени по формуле:

$$K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL = 1,5 - 0,04 \times 21 - 0,15 \times 0,43 + 0,355 \times 7,2 = 3,1.$$

Рассчитан коэффициент К для левой голени по формуле:

$$K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL = 1,5 - 0,04 \times 23 - 0,15 \times 0,46 + 0,355 \times 7,3 = 3,1025.$$

Заключение: прогнозируют тотальное поражения обеих стоп.

Рекомендовано: Назначение усиленной антикоагулянтной, дезагрегантной, симптоматической терапия [А.А. Алексеев и соавт., 2017].

На 12 сутки определилась демаркационная линия. Уровень ее располагался в области нижней трети обеих голени (Рисунок 9). Согласно принятым рекомендациям выполнена ампутация обих нижних конечностей на уровне с/трети обеих голени по сформировавшейся демаркационной линии. Послеоперационный период протекал без осложнений. Заживление раны - первичным натяжением.

Выписана на 17-е сутки в удовлетворительном состоянии.



**Рисунок 9** - Поражение тканей на уровне средней трети обеих голеней

**Пример 2.** Пациент Н., 42 лет, поступил в Краевой ожоговой центр ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» 19.12.2017 г. с диагнозом: Отморожение дистального сегмента левой стопы III–IV степени, поздний реактивный период. Сопутствующей патологии не выявлено. Курит 7 лет.

19.12.17 г. Пациенту до начала лечения при поступлении в стационар выполнена ЭНМГ: амплитуда М-ответа левой стопы составила 0,9 мВ, резидуальная латентность составила – 5,5 мС, скорость распространения возбуждения – 30 мС.

Рассчитан коэффициент К по формуле:

$$K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL = 1,5 - 0,04 \times 30 - 0,15 \times 0,9 + 0,355 \times 5,5 = 2,1175.$$

Заключение: прогнозируют уровень поражения в области предплюсно-плюсневого сочленения (Рисунок 10).

Рекомендовано: Назначение стандартной терапии местной холодовой травмы [А.А. Алексеев и соавт., 2017].

На 10-е сутки сформировалась демаркационная линия на уровне предплюсно-плюсневого сочленения. Выполнена остеонекрэктомия по демаркационной линии.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Заживление раны - первичным натяжением.

Выписан на 17-е сутки в удовлетворительном состоянии.



**Рисунок 10** - Поражение тканей на уровне средней трети обеих стоп

**Пример 3.** Пациент С., 40 лет, поступил в Краевой ожоговый центр ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» 19.02.2018 г. с диагнозом: отморожение обеих стоп III–IV степени, поздний реактивный период. Не курит.

19.02.18 г. пациенту до начала лечения при поступлении в стационар выполнена ЭНМГ: амплитуда М-ответа правой голени составила 0,92 мВ, левой – 1,02 мВ; резидуальная латентность правой голени – 4 мС, левой – 4,1 мС; скорость распространения возбуждения в области правой голени – 39 мС, левой голени – 37,5 мС.

Рассчитан коэффициент К для правой голени по формуле:

$$K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL = 1,5 - 0,04 \times 39 - 0,15 \times 0,92 + 0,355 \times 4 = 1,222.$$

Рассчитан коэффициент К для левой голени по формуле:

$$K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL = 1,5 - 0,04 \times 37,5 - 0,15 \times 1,02 + 0,355 \times 4,1 = 1,2575.$$

Заключение: прогнозируют поражение на уровне пальцев (Рисунок 11).

Рекомендовано: Назначение стандартной терапии местной холодовой травмы [А.А. Алексеев и соавт., 2017].

На 11-е сутки согласно принятым рекомендациям выполнена остеонекрэктомия по демаркационной линии на уровне пальцев. Послеоперационный период протекал без осложнений. Заживление раны первичным натяжением.

Выписан на 18-е сутки в удовлетворительном состоянии.



**Рисунок 11** - Поражение на уровне пальцев обеих стоп

Данный способ использован для прогнозирования уровня поражения при местной холодовой травме нижних конечностей у 57 пациентов. Результаты представлены в Таблице 35.

**Таблица 35** - Уровень поражения при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей

Кол-во больных (n)	Возраст, лет (M±m)	AMR (мВ) (M±m)	SEP (мС)	RL (мС)	Коэффициент К	Уровень повреждения
20	40,5±8,4	1,16±0,2 4	36,68±0,1 6	4,48±0,48	1,3±0,24	поражение на уровне пальцев
17	40±8,3	0,74±0,2 0	27,25±3,1 3	5,48±0,34	2,6±0,38	поражение до уровня средней трети стопы
20	37±4,3	0,53±0,1 6	21,36±2,1 8	7,56±0,40	3,4±0,32	тотальное поражение стопы

Эффективность способа прогнозирования уровня поражения при местной холодовой травме III–IV степени дистальных отделов нижних конечностей составляет 92%.

Для определения риска осложнений в послеоперационном периоде при отморожениях рассчитывают ранее описанный коэффициент осложнений (К), сформированным на основании уравнения линейной регрессии с применением коэффициента детерминации. При К менее 1,0 прогнозируют осложненное течение раневого процесса после операции.

#### Примеры конкретного выполнения

**Пример 4.** Пациентка П., 43 лет, поступила в Краевой ожоговый центр ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» 22.12.2017 г. с диагнозом: отморожение обеих стоп III – IV степени, поздний реактивный период. Преморбидная патология не выражена, сопутствующих заболеваний нет. Курит в течение 5 лет. Назначена стандартная антикоагулянтная, дезагрегантная, симптоматическая терапия [А.А. Алексеев и соавт., 2017].

22.12.17 г. пациентке до начала лечения с помощью аппарата Нейро-ВМП, компании Нейрософт (г. Иваново) выполнена накожная стимуляционная электронейромиография обеих стоп импульсами в диапазоне 10-22 мА, продолжительностью 300 мС. Амплитуда М-ответа правой стопы составила 0,43 мВ, левой стопы – 0,46 мВ.

Рассчитан коэффициент К для правой стопы по формуле:

$$K = 1,7 \times АМА - 0,65 = 1,7 \times 0,43 - 0,65 = 0,081.$$

Рассчитан коэффициент К для левой стопы по формуле:

$$K = 1,7 \times АМА - 0,65 = 1,7 \times 0,46 - 0,65 = 0,132.$$

Заключение: прогнозируют осложненное течение раневого процесса обеих стоп в послеоперационном периоде (Рисунок 12).

Учитывая возможное развитие послеоперационных осложнений, терапия усилена дополнительным введением антикоагулянтов, увеличением объема инфузионной терапии, проводилась коррекция местного лечения. В ходе лечения пациентка не соблюдала рекомендации врача, нарушала стационарный режим.

На 12-е сутки согласно принятым рекомендациям выполнена остеонекрэктомия в области обеих стоп по сформировавшейся демаркационной линии. Послеоперационный период протекал с осложнениями: нагноение послеоперационной раны, вторичный некроз. В связи с чем пациентке потребовалась повторная операция, а также пролонгирование времени стационарного лечения. Выписана на 22 сутки в удовлетворительном состоянии.



**Рисунок 12** - Осложненный послеоперационный период



**Пример 5.** Пациент С., 52 лет, поступил в Краевой ожоговой центр ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» 17.11.2017 г. с диагнозом: Отморожение правой стопы III – IV степени, поздний реактивный период. Сопутствующей патологии не выявлено. Курит 10 лет. Назначена стандартная терапия местной холодовой травмы [А.А. Алексеев и соавт., 2017].

17.11.17 г. пациенту до начала лечения выполнена ЭНМГ, амплитуда М-ответа правой стопы составила 0,98 мВ.

Рассчитан коэффициент К по формуле:

$$K = 1,7 \times \text{АМА} - 0,65 = 1,7 \times 0,98 - 0,65 = 1,016.$$

Заключение: прогнозируют благоприятное течение раневого процесса (Рисунок 13).

На 10-е сутки выполнена остеонекрэктомия в области пораженного сегмента по демаркационной линии. Осложнений в послеоперационном периоде не отмечено [А.А. Алексеев и соавт., 2017]. Заживление раны - первичным натяжением. Выписан на 17 сутки в удовлетворительном состоянии.



**Рисунок 13** - Благоприятный послеоперационный период

**Пример 6.** Пациент Н., 38 лет, поступил в Краевой ожоговый центр ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» 17.01.2018 г. с диагнозом: отморожение пальцев обеих стоп и кистей III – IV степени, поздний реактивный период. Преморбидная патология – бронхиальная астма, стадия ремиссии, неосложненное течение - 5 лет, терапию не получает. Курит 7 лет. Назначена стандартная терапия [А.А. Алексеев и соавт., 2017].

17.01.18 г. пациенту до начала лечения выполнена ЭНМГ, амплитуда М-ответа правой стопы составила 0,39 мВ, левой – 0,37 мВ.

Рассчитан коэффициент К для правой стопы по формуле:

$$K = 1,7 \times AMA - 0,65 = 1,7 \times 0,39 - 0,65 = 0,013.$$

Рассчитан коэффициент К для левой стопы по формуле:

$$K = 1,7 \times AMA - 0,65 = 1,7 \times 0,37 - 0,65 = - 0,021.$$

Заключение: прогнозируют осложненное течение раневого процесса в послеоперационном периоде.

Учитывая возможное развитие послеоперационных осложнений, терапия усилена дополнительной инфузией реамбина по предложенной схеме, введением антикоагулянтов, увеличением объема инфузионной, дезагрегантной терапии с проведением коррекция местного лечения.

На 11-е сутки согласно принятым рекомендациям выполнена остеонекрэктомия по демаркационной линии. Заживление раны первичным натяжением. Выписан на 18 сутки в удовлетворительном состоянии (Рисунок 14).



**Рисунок 14** - Благоприятное течение послеоперационного периода и раневого процесса

Данный способ использован для прогнозирования осложненного течения раневого процесса в послеоперационном периоде при местной холодовой травме нижних конечностей у 40 пациентов. Результаты представлены в Таблице 36.

**Таблица 36** - Послеоперационные осложнения при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей

Кол-во больных (n)	Возраст, лет (M±m)	Амп. М-ответа (мВ) (M±m)	Вид осложнений	
			Вторичный некроз	Нагноение послеоперационной раны
21	40,5±8,4	1,04±0,03	1 (1,5%)	1 (1,5%)
19	40±8,3	0,4±0,02	15 (79%)	2 (10,5%)

Эффективность способа прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме III – IV степени дистальных отделов нижних конечностей составляет 91%.

Следовательно, реализация предлагаемого персонализированного подхода в клиническому прогнозированию уровня повреждения тканей и возможных нежелательных осложнениях в послеоперационном периоде при криотравме нижних конечностей позволяет вовремя провести направленные лечебные профилактические мероприятия пострадавшим, а также предотвращать развитие постальтерационных осложнений, что в свою очередь приводит к сокращению сроков нетрудоспособности и предотвращает вероятную инвалидизацию пострадавших.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особенности микроциркуляции, дисфункция эндотелия и иннервации занимают одно из ведущих мест в патогенезе местной холодовой травмы и эффективности ее комплексного лечения.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание выраженное снижение биоэлектрической активности мышц (БЭА) пораженной конечности в разные периоды местной холодовой травмы. Это еще раз подтверждает патогенетическую обоснованность выделения периодов отморожений. Причем в поздние сроки травмы БЭА имела тенденцию к восстановлению. Такая динамика соответствует общепринятым представлениям о течении раневого процесса при отморожениях и согласуется с нервно-рефлекторной теорией отморожений [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; M. Z. Ramadan et al., 2017]. Сторонники этой теории придерживаются двойственной ситуации, в основе которой лежит выброс в кровотоки большого количества «вазопрессоров» и патологической афферентной импульсации из очага альтерации. По мнению авторов, формируется порочный круг, приводящий к некрозу тканей и неблагоприятным последствиям действия холода [Ю.С. Винник и соавт., 2011].

В позднем реактивном периоде в исследуемой группе амплитуда М-ответа ( $aM_0$ ) и скорость распространения возбуждения (СРВ) достоверно снижались относительно контроля. Резидуальная латентность (РЛ) повышалась относительно контрольной группы. Подобное явление, вероятно, связано со стабильной дисфункцией эндотелия, продолжающимся постгипоксическим повреждением тканей с истощением активных механизмов регуляции тонуса, и как следствие, рефрактерностью миоцитов перифокальных тканей. Нарушение функции мышечной проводимости опосредуется и деятельностью нервной ткани [Т.Я. Яхьева, 2020; V. Pourheydar et al., 2020]. Вероятно, за счет длительного поступления афферентной импульсации из зоны повреждения формируется

патологическая петля с пролонгированным спазмом сосудов тканей проксимальнее линии демаркации.

Также нельзя отрицать постепенно нарастающую демиелинизацию периферической нервной ткани проксимальнее очага некроза, как следствие острого гипоксически-ишемического повреждения нервов в зоне паранекроза при первичной и вторичной альтерации [Pourheydar et al., 2020]. Это явление отражается и на снижении РЛ и СРВ, что подтверждается выявленными изменениями в электронейромиограммах.

Известно, что в позднем реактивном периоде у пациентов с местной холодовой травмой значительно возрастает агрегация тромбоцитов и уровень провоспалительных интерлейкинов, повышается активность перекисного окисления липидов, что определяет воспалительные процессы в тканях, усугубляет локальное тромбообразование и гипоксическое повреждение, в том числе нервной ткани [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; Ю.С. Винник с соавт., 2011].

В настоящий момент тромбоциты признаны клетками воспаления и иммунитета [Anitua E., Padilla S. et al., 2018, Li P., Zhang R., Zhou Q. et al., 2018]. Доказано, что тромбоциты являются результатом ремоделирования мегакариоцитов костного мозга. Установлено, что ведущим участником в моделировании и ремоделировании цитоскелета в процессах образования протромбоцитов является серотонин, что опосредовано вовлеченностью путей Rho/ROCK и Erk1/2 и тромбоцитарных рецепторов 5HT<sub>1A</sub>/1B/1D<sub>C</sub> и 5HT<sub>4R</sub> [Gorinski N., Kowalsman N., Renner U. et al, 2012].

У пациентов с отморожениями отмечено снижение уровня тромбоцитов в периферической крови [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008, Ю.С. Винник и соавт., 2011]. В наших работах мы объяснили этот феномен потреблением кровяных пластинок и реализацией процессов сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и воспаления [М.И. Михайличенко и соавт., 2008]. Высказанные предположения согласуются с мнением многих ученых [Strijdom H. 2012]. Однако, выявленные метаболиты дисфункции эндотелия, в частности миелопероксидаза и кальпротектин, разрушают периферические мотонейроны и миоциты,

синтезирующие серотонин [B. Shao, M. Oda, J. Oram, J. Heinecke, 2010]. Вероятное снижение уровня серотонина ингибирует тромбоцитопоз и дифференцировку мегакариоцитов, что отражается в снижении уровня тромбоцитов в периферической крови у пострадавших с криоповреждением. Низкий уровень кровяных пластинок провоцирует снижение и дискоординацию процессов воспаления, а также механизмов экстравазации иммунокомпетентных клеток у пострадавших с криоповреждением, что отражается в неблагоприятном течении постальтерационного периода.

Кровяные пластинки обладают важнейшими секреторными и дегрануляционными функциями, экспрессируют адгезивные протеины, участвуют в коагуляции и репарации [Menchisheva Y., Mirzakulova U., 2018]. Некоторые из секреторируемых белков опосредуют перекрестный контакт тромбоцитов с иммунокомпетентными клетками и эндотелиоцитами. Соответственно, тромбоциты играют важнейшую роль в воспалительных, пролиферативных событиях, ремоделировании тканей и репарации у пострадавших с отморожениями, находясь в основе патогенеза криотравмы [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].

В периоде гранулирования и эпителизации происходит постепенное восстановление и репарация тканей, на это косвенно указывает возрастающая скорость распространения возбуждения. При этом одной их специфических особенностей отморожений является относительность критериев выздоровления [A. M. Saemi et al., 2009; D. S. Shenaq et al., 2017]. Необходимо отметить, что абсолютного выздоровления при глубоких отморожениях в современной литературе не описано и в принципе невозможно.

Выявленные нами изменения ЭНМГ, вероятно, сохраняются в течение длительного времени и неблагоприятно сказываются на реабилитации пострадавших. Явными звеньями патогенеза при этом являются повреждения периферических нервов. Дегенерации периферической нервной системы в настоящее время посвящено множество работ [Pourheydar et al., 2020]. Широко изучается комплексный регионарный болевой синдром (КРБС), в основе которого лежит гиперактивация тучных клеток в ходе реализации феномена реперфузии

[Т.Я. Яхьева, 2020]. Не исключено, что широко освещенный в литературе и подробно изученный отек мягких тканей при местной холодовой травме способен провоцировать КРБС с последующей интерстициальной альтерацией. Этот факт подтверждается работами В.А. Иванова (2009), в частности, обнаружением в жидкости пузырей иммунокомпетентных клеток.

Большое количество публикаций посвящено нейропатиям при сахарном диабете [Рахиджанова М.Т. и соавт., 2014; Руюткина Л.А. и соавт., 2018; Bhokta N.R. et al., 2011]. Ученые пришли к мнению, что гипоксия, дефицит NO и повышенный уровень молочной кислоты пагубно влияют на периферическую нервную ткань, создавая условия для осложненного течения заболевания и развитие осложнений, особенно в области нижних конечностей. Частота калечащих операций у больных сахарным диабетом находится на высоком уровне и вызывает опасения клиницистов. Модель периферической нейропатии у пострадавших с отморожениями имеет общие начальные точки, в виде гипоксии тканей, сниженного уровня NO, повышения уровня молочной кислоты и т.д. Последствия оперативного лечения пострадавших с отморожениями, наряду с больными с диабетической стопой, имеют неутешительные результаты [Руюткина Л.А. и соавт., 2018; A. Shah et al., 2019; M. Sakiyama et al., 2011; A. M. Ionescu et al., 2017]. В связи с этим, повреждение и дисфункция периферической нервной ткани – это еще одна составляющая острой и нерешенной проблемы последствий местной холодовой травмы.

Даже после отморожений II степени, а тем более – после комплексного лечения поражений III-IV степени с большой частотой развиваются невриты, невроаскулиты, облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей и трофические нарушения дистальных сегментов стоп. Они с трудом поддаются лечению, а в послеоперационном периоде часто отмечаются нагноения мягких тканей культи и вторичный некроз. Эти осложнения нередко ведут к сепсису и протяженным тромбозам [A. Shitzer et al., 2007; B. E. Plougan et al., 2011]. При нарушениях чувствительной иннервации после отморожений неизбежно разобщение между потребностями тканей в трофике и оценке организма этого

процесса с вытекающими неблагоприятными последствиями. Нарушения симпатической иннервации – прямой путь к дистрофии тканей.

Интересен опыт наблюдения случаев отморожений II степени у детей с локализацией в местах диафизов пальцев. В дальнейшем регистрируется отставание их в росте [A. Shah et al., 2019, S. J. Poulakidas et al., 2016; R. Boles et al., 2018].

Последствия местной холодовой травмы являются результатом финальной стадии воспаления - пролиферации. Работы, посвященные дисфункции эндотелия при местной холодовой травме, подтверждают этот факт и сводятся к тому, что эндотелий, как орган внутренней секреции высочайшей дифференциации, неспособен в дальнейшем адекватно реализовывать свои инкреторные функции, провоцируя тем самым «хроническую» эндотелиальную дисфункцию в очаге перенесенной альтерации и в перифокальных тканях [Ю.С. Винник и соавт., 2011; L. M. Jones et al., 2017; M. M. Hanlon et al., 2019; C. Kraft et al., 2017].

«Хроническая» эндотелиальная дисфункция, дискоординация метаболизма тромбоцитов и периферическая холодовая нейропатия – основные составляющие патогенеза криотравмы и фундамент для тяжелых, резистентных к терапии последствий местной холодовой травмы.

В ходе исследования установлено, что у пострадавших с местной холодовой травмой происходит синхронное изменение показателей ЭНМГ и ЛДФ. Значительное снижение амплитуды М-ответа, ПМ и одновременное повышение показателя шунтирования указывает на комплексный дефицит кровенаполнения пораженной конечности и периферическую «острую» нейропатию, которые связаны с нарастающей дисфункцией эндотелия и острым периферическим интравазальным и экстравазальным воспалением. Увеличение уровня повреждения конечности сопровождается усугублением изменений показателей ЭНМГ. Это отражено в «сильной» корреляционной связи между амплитудой М-ответа, СРВ и уровнем пораженных тканей. Вероятно, увеличению зоны альтерации способствует неблагоприятный цитокиновый фон и распространение зоны паранекроза значительно выше уровня альтерации. Показано, что в крови,



оттекающей от пораженной конечности, уровень провоспалительных цитокинов значительно превышает нормальное значение [К.Г. Шаповалов и соавт., 2009]. Это явление нашло отражение и в нарастающей периферической нейропатии относительно уровня пораженных тканей.

Выявленные механизмы расстройств микрокровоотока в определенной мере имеют сходство с таковыми при атеросклерозе сосудов конечностей [С. Н. Lee et al., 2019; М. М. Tuscureanu et al., 2019]. В случае острой локальной холодовой травмы основным патогенным фактором в инициации дисфункции эндотелия является асептическое воспаление, и как следствие, активация иммунного повреждения клеток эндотелия наряду с гиперсекрецией молекул адгезии как в очаге воспаления, так и перифокально. Данная теория атеросклероза в настоящее время активно изучается и имеет серьезную доказательную базу [P. R. Dirak et al., 2015].

В зоне альтерации происходит активная экспрессия на поверхности эндотелия адгезивных молекул ICAM-1, ICAM-2, VCAM, E- и P- селектинов, а также большого количества тромбогенных молекул, в частности фактора фон Виллебранда, тромбоксана A<sub>2</sub> и ингибитора активатора плазминогена [Ю.С. Винник и соавт., 2011; К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Необходимо указать, что дисбаланс происходит в сторону вазоконстрикции. Это отражается в снижении показателя микроциркуляции и увеличении сброса крови по артериовенозным шунтам в обход нутритивного звена микроциркуляторного русла, возрастает показатель шунтирования. Нарастающая гипоксия еще более угнетает выработку важнейших периферических вазодилататоров, в частности оксида азота (NO) и простациклина I<sub>2</sub> (P<sub>g</sub>I<sub>2</sub>) [Y. Savina et al., 2019; A. Ghumman et al., 2019; R. A. Yeager et al., 1983; T. Gonzaga et al., 2016]. Таким образом, замыкается порочный круг.

Описанный нами ранее процесс лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у пациентов с местной холодовой травмой способствует миграции активированных нейтрофилов и моноцитов в интерстициальное пространство, где они продолжают реализовывать свои разноплановые функции [Б.И. Кузник и соавт., 2014].

Происходит активная выработка провоспалительных цитокинов, протеолитических ферментов и активных форм кислорода, что, вне всякого сомнения, негативно сказывается на периферической нервной ткани и провоцирует ригидность гладкой мускулатуры сосудов. И вновь этот факт подтверждается снижением скорости распространения возбуждения, амплитуды нейрогенного диапазона и повышением резидуальной латентности у пациентов с местной холодовой травмой. Выявленные изменения усугубляются с увеличением объема поврежденных тканей.

Установленная обратная умеренная связь по шкале Чеддока между СРВ и ПШ указывает на прямой сброс крови из артерии в вену, минуя капиллярное русло, провоцируя значительное снижение артериального давления в капиллярах и уменьшению напряжения сдвига [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Компенсаторно активированные эндотелиальные клетки продуцируют значительное количество вазоконстрикторов, еще более усугубляя вазоспазм и локальное воспаление. Нарастающий отек, реализация иммунных процессов в интерстиции способствует демиелинизации нервных волокон, что нашло свое отражение в показателях ЭНМГ и ЛДФ. Вместе с тем, холодовая альтерация способствует повреждению нервных структур, что провоцирует постоянную патологическую импульсацию и, как следствие, периферический вазоспазм. Открываются артериовенозные шунты. О первичности данных процессов говорить сложно, не исключается и двойственная природа корреляционной связи. Эту гипотезу подтверждает содружественное увеличение РЛ и ПШ, между которыми выявлена выявлена прямая умеренная связь по шкале Чеддока.

Полученные данные связаны как со стойкой периферической нейродеструкцией, продолжающемся повреждением тканей, так и с истощением активных механизмов регуляции тонуса, рефрактерности гладкой мускулатуры сосудистой стенки [J. Drinane et al., 2019; P. Tikuisis et al., 2007; P. A Tilney, 2019].

Обращает на себя внимание высокий уровень периферического нейрофиламента относительно группы контроля. Этот факт косвенно

свидетельствует о дистрофических процессах, нарушении нервной проводимости и регрессии микроциркуляции, что, как следствие, ведет к затяжному течению раневого процесса у большинства пострадавших. Даже на 30-е сутки криотравмы уровень pNF-H оставался значительно выше контроля.

Выявленная динамика соответствует общепринятым представлениям о течении раневого процесса при отморожениях и указывает на стойкую периферическую нейропатию [R. M. Nygaard et al., 2017; H. Su et al., 2015; R. Kaplan et al., 2016].

Установленное снижение биоэлектрической активности мышц напрямую связано с резким повышением уровня периферического нейрофиламента H. Происходящая выраженная аксональная дегенерация нашла свое отражение в снижении скорости распространения возбуждения, амплитуды М-ответа и резидуальной латентности.

Известно, что проприоцептивная иннервация связана со скелетной мускулатурой и напрямую отвечает за расслабление мышечной ткани. Аксональное повреждение способствует стойкому миоспазму, усугубляя ишемию и клеточное повреждение. Вероятно, у пациентов с местной холодовой травмой реализуется феномен Уоллера, который заключается в ишемической дегенерации нейронов с последующим восстановлением [М.И. Михайличенко и соавт., 2020]. Следует отметить, что продукты распада миелина поглощаются активированными фагоцитами и микроглией в течение нескольких недель. Макрофаги в межучасточном пространстве выделяют огромное количество биологически активных веществ [Б.И. Кузник и соавт., 2014]. Подобная ситуация, вероятно, физиологически обоснована и направлена на скорейшую репарацию. Оставшиеся шванновские оболочки провоцирует нейрогенез [L.A. Zilliox, 2017]. Природа восстановления нервной ткани соответствуют и периодам холодовой травмы.

Необходимо отметить, что после повреждения нейронов их функция в зоне поражения все же может частично восстанавливаться [L.A. Zilliox, 2017]. Это объясняется пластичностью выживших нервных клеток, которые формируют новые контакты с теми нейронами, которые утратили свои афферентные связи.

Однако, сформированное нервное волокно не в состоянии полноценно реализовать свою функцию. Это доказывает холододвой нейроваскулит, который встречается фактически у 100% пострадавших. Причем адекватной коррекции данной проблемы пока не существует [К. Jussila et al., 2017].

У пациентов с местной холододвой травмой отмечено резкое повышение уровня сывороточного кальпротектина и лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов во всех исследуемых группах и в динамике. Неблагоприятным фактором является то, что в крови определяются коаграты с 4-6 тромбоцитами, которые, вне всякого сомнения, усугубляют ишемию тканей зоны повреждения.

Современные научные исследования направлены именно на профилактику осложнений и снижение рецидивов большинства катастроф, как эндогенного генеза, так и вследствие экзогенных травм [Y. Urata et al., 2019; V. Shahi et al., 2015]. Доказано, что местная холододвой травма практически всегда протекает с наличием поздних осложнений [J. A. Twomey et al., 2005; D. S. Shenaq et al., 2019], связанных с нарушениями микроциркуляции, в генезе которых существенную роль играют тромбоциты, их гликопротеиновые рецепторы (Gp) и прочие активирующие трансмембранные белки вещества, такие как сывороточный кальпротектин.

В исследованиях Kuhnla A., Reinthaler M. (2019) о функциях тромбоцитов у практически здоровых лиц в молодом возрасте показано, что во время своего старения циркулирующие тромбоциты становятся все более активными, и изменяют свой агрегационный потенциал, что ранее было названо "истощением тромбоцитов". Исходя из этого, можно сделать вывод, что в кровотоке функционально не все кровяные пластинки одинаковы. Возможно, часть из них представлено именно «истощенными» формами, которые и реализуют неадекватные процессы воспаления и тромбообразования, а метаболиты и хемокины, поступающие в кровоток в ходе их дегрануляции, создают предпосылки для затяжного тромбообразования и воспаления. Этот факт подтверждает предположение Б.И. Кузника и Ю.А. Витковского (2014) о клеточной сепарации в области дуги аорты. По мнению авторов «полноценные» и

молодые кровяные клетки распределяются в бассейн головного мозга, при этом оставшиеся – на периферию.

Немаловажным фактором является и механическое внутрисосудистое напряжение сдвига в активации тромбоцитов. Известно, что у всех пациентов с местной холодовой травмой изменены скоростные показатели кровотока ввиду отека мягких тканей в очаге повреждения и перифокально. Эти факты подтверждены нашими инструментальными тестами [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Lee H., Lee K. (2017) исследовали влияние сдвиговой активации тромбоцитов на агрегацию эритроцитов. Авторы установили, что тромбоциты, активированные высоким напряжением сдвига, выделяют вещества, которые могут влиять на гемореологические характеристики, способствуя образованию коагратов не только с лейкоцитами, но и с эритроцитами. Вероятно, эти явления могут быть результатом увеличения силы клеточной адгезии на мембранах красных кровяных пластинок за счет секретируемых веществ из активированных тромбоцитов.

Ввиду вовлечения в процесс тромбообразования у пациентов с МХТ эритроцитов, эти форменные элементы выпадают из кровообращения и не в состоянии реализовать свои основные функции, провоцируя нарастающую гипоксию и метаболический стресс в очаге повреждения. Что опять же подтверждено инструментальными исследованиями [Ю.С. Винник и соавт., 2011] и особенностями течения последствий отморожений. Нарушение функциональной составляющей эритроцита – это лишь верхушка айсберга формирующихся биологически последовательных реакций и дистальной альтерации. Известно, что эритроциты могут адгезировать на своей поверхности лишь активированные лейкоциты, экспрессирующие тканевой фактор [Б.И.Кузник и соавт., 2014]. Активированные лейкоциты выделяют большое количество протеолитических ферментов, разрушающие мембраны окружающих клеток, в том числе тромбоцитов и эритроцитов. При этом в кровяной поток попадают новые порции кальпротектина, тканевой фактор и микровезикулы, на мембране которых реализуется тромбообразование [Н.Н. Петрищев и соавт., 2003; Л.В. Васина и

соавт., 2017], снижающее скорость кровотока и напряжение сдвига в очаге альтерации.

Также необходимо указать, что активированные в ходе межклеточных взаимодействий лейкоциты способны повреждать клеточную мембрану ввиду активации свободно-радикальных процессов. В частности, миелопероксидаза, выделяемая активными лейкоцитами, способствует образованию в лейкоцитах хлорноватой кислоты и перераспределению активных форм кислорода, усугубляя цитотоксическую активность последних [I. Rashid et al., 2018; B. Shao et al., 2010; B. Zhou et al., 2017; S. Nicholls et al., 2005; E. V. Shamova et al., 2019]. Не исключено, что именно подавление гликолиза и метаболический стресс, опосредованно через межклеточные взаимодействия и инкрецию L1-протеина, запускают каскад патологических процессов у пациентов с местной холодовой травмой, реализуя порочный круг и затяжное, неадекватное течение репаративных процессов у пациентов с отморожениями.

Показано, что повышенный уровень кальпротектина положительно коррелировал с агрегацией и активацией тромбоцитов у пациентов со стабильной стенокардией напряжения [A. D. Blann et al., 2000; L. Gullestad et al., 2012]. Причем авторы связывают именно повышение уровня сывороточного белка с последующей активацией тромбоцитов, провоцирующей неблагоприятные коронарные события. Не исключается, что высокие уровни кальпротектина ассоциированы с побочным эффектом аспирина. Авторы предположили, что именно дезагреганты провоцируют повышенное содержание сывороточного кальпротектина у пациентов с ИБС. Механизм данного феномена до конца не установлен. Возможно, у проводимой дезагрегантной терапии есть и нежелательные эффекты, которые, вероятно, способны провоцировать в будущем неблагоприятные последствия как у пациентов с отморожениями, так и с другой патологией.

Таким образом, о роли исследованных межклеточных взаимодействий и об опосредующих эти отношения веществах при холодовой травме складывается неоднозначное мнение. С одной стороны, формирующиеся коагрегаты

способствуют нарушению микроциркуляции и ферментативному взрыву перифокально, что, безусловно, пагубно сказывается на течении и прогнозе криотравмы. С другой стороны – клеточные агрегаты создают необходимые условия для миграции форменных элементов в межклеточное пространство для реализации процессов репарации.

Выявлено резкое повышение содержания коллагеназ второго подсемейства у пациентов с местной холодовой травмой. Обращает на себя внимание тот факт, что статистически значимого снижения MMP-9 не регистрируется даже в отдаленные сроки с момента травмы. Происходит значительный сбой в ремоделировании клеточного матрикса, репарации тканей и ангиогенезе, хотя не исключается и нетипичное, затяжное течение репаративных процессов.

Ранее проведенные научные исследования у пациентов с деформирующим артрозом (ДОА), направленные на выявления матриксных металлопротеиназ, также выявили значительное повышение уровня исследуемых маркеров в сыворотке больных. Ученые пришли к выводу, что изменение уровня коллагеназ – одна из причин затяжного и хронического течения заболевания. Не исключено, что предиктором “хронизации” процессов альтерации у пациентов с МХТ являются именно коллагеназы. Это подтверждает и значительное количество неблагоприятных исходов травмы у пострадавших. По мнению многих авторов, осложнения наблюдаются у большинства больных с местной холодовой травмой [E. Lopez-Rivera et al., 2005; M. Pino, 2005; H. Zhang et al., 2011].

Кроме того, MMP-2 наряду с некоторыми другими MMPs, могут ингибировать ангиогенез. Это связывают с их способностью образовывать антиангиогенные полипептиды путем превращения плазминогена в ангиостатин, который угнетает пролиферацию и усиливает апоптоз клеток эндотелия [E. Lopez-Rivera et al., 2005]. Факт угнетения микроциркуляции подтвержден нашими исследованиями у пациентов с криотравмой [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. 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 [M. Pino, 2005].

Известно, что уровень IL-1, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  повышен во все периоды МХТ [Ю.С Винник и соавт., 2011]. Однако в поздние периоды 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 даже в отдаленные периоды криповреждения. Синтез этой коллагеназы происходит в основном в макрофагах и тромбоцитах, реализующих свои функции в интерстициальном пространстве. При этом одной из особенностей MMP-9 является хемотаксис фибробластов в межклеточное пространство для реализации процессов репарации. С другой стороны, MMP-9 провоцирует десмоплазию коллагена [E. Lopez-Rivera et al., 2005; M. Pino, 2005; H. Zhang et al., 2011]. Ремоделирование коллагена в очаге поражения способствует дискоординации пролиферации и, как следствие, затяжному и неблагоприятному течению раневого процесса.

Lopez-Rivera E. и соавторы указывают, что некоторые виды MMP располагаются на плазматической мембране эндотелиальных клеток, а оксид азота (NO) способствует их высвобождению с последующим ремоделированием соединительной ткани. Известно, что уровень NO понижен во все периоды местной холодовой травмы [Е.А. Томина и соавт., 2008]. В настоящее время NO позиционируется как важнейший эндотелиальный вазодилататор и признан компенсаторным механизмом патологической вазоконстрикции у пациентов с местной холодовой травмой [S. Della Bella et al., 2001]. Биологические эффекты нитроксида азота связаны с вазодилатацией, супрессией агрегации тромбоцитов и провоспалительной активности некоторых клеток. Возможно, в ситуации дистресса коллагеназы препятствуют дисфункции эндотелия путем устранения клеточных структур самого эндотелия для обеспечения адекватного обмена веществ в тканях. Однако не исключено их значение и как маркеров срыва адекватного течения репаративных процессов.



В полученных нами данных обращает на себя внимание повышение уровня MMP-2 и MMP-9 в сыворотке крови пациентов с МХТ относительно группы контроля в ранние сроки отморожения. Уровень MMP-2 снижался до значений контрольной группы, а показатели MMP-9 оставались значительно выше нормы в поздние сроки с момента травмы. Данный факт патогенетически обосновывает большое количество осложнений у пациентов с МХТ.

Необходимо указать, что значимой динамики исследуемых маркеров не происходит и в отдаленные сроки криоповреждения. Вероятно, при отморожениях реализуется значительный сбой в ремоделировании цитоскелета, репарации тканей, ангиогенеза, имеются предпосылки к нетипичному, затяжному течению репаративных процессов.

Проведенные ранее научные исследования у пациентов с деформирующим артрозом, в осложненном акушерстве, у пациентов с ИБС, направленные на выявление уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, также выявили стойкое повышение уровня исследуемых предикторов в сыворотке больных [E. Lopez-Rivera et al., 2005; M. Pino, 2005; H. Zhang et al., 2011]. Ученые сделали вывод, что металлопротеиназы – одна из патогенетических причин хронизации любой патологии. Не исключено, что предиктором неблагоприятного течения местной холодовой травмы являются именно коллагеназы. Это доказывает и большое количество неблагоприятных последствий травмы. По мнению ряда авторов, осложнения присутствуют у большинства пострадавших с местной холодовой травмой [H. Yanagisawa, 2013; K. Zafren 2013; S. E. McIntosh et al., 2019; A. Wexler et al., 2017].

Повышенное содержание ингибиторов матриксных металлопротеиназ, вероятно, указывает на попытку со стороны организма стабилизировать формирующуюся катастрофу в очаге альтерации. Нами выявлено резкое повышение TIMP-1 и TIMP-2 во всех периодах криоповреждения. Обращает на себя внимание факт отсутствия корреляции TIMP у пациентов с самыми обширными поражениями и наиболее легкой травмой, ограниченной пальцами стоп. Также необходимо указать и на то, что уровень TIMP не снижается и на 30

сутки с момента криповреждения (Рисунок 15). Данный феномен, вероятно, связан с гибелью костной ткани, так как ингибиторы матриксных металлопротеиназ депонируются в основном в остеоцитах [H. Nagase et al., 2001].

Согласно современным научным данным, при фиброзной дезорганизации тканей показатель ММР снижается, а уровень их ингибиторов напротив возрастает. При деградации коллагена, наоборот, содержание коллагеназ увеличивается, а ингибиторов уменьшается [H. Yanagisawa, 2013; K. Zafren 2013; S. E. McIntosh et al., 2019; A. Wexler et al., 2017; H. Nagase et al., 2001]. У пострадавших с МХТ мы видим увеличение всех исследованных биомаркеров системы матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, даже в случае относительно легкой холодовой травмы.

Сравнительно недавно Cabral-Pacheco G.A. et al. (2020) показали, что у пациентов с онкопроцессом в поджелудочной железе уровни ММР и TIMP значительно повышены. Учитывая, что комплекс ММР и TIMP формируется по типу «ключ-замок», авторы предположили, что повышение уровня подобных биологических «замков», служит отражением противоопухолевой реакции и клеток с попыткой ограничения очага альтерации. Не исключено, что у пациентов с МХТ реализуется подобный биологический феномен формирования клеточного микроокружения, направленный на отграничение очага поврежденных тканей путем грубого ремоделирования внеклеточного матрикса и изменения конформации клеточной мембраны.

Известно, что ММР-2 в сочетании другими коллагеназами, способствуют угнетению ангиогенеза. Это явление связывают с их способностью формировать антиангиогенные пептиды путем трансформации плазминогена в ангиостатин, который ингибирует пролиферацию и усугубляет апоптоз клеток эндотелия. Это еще одно подтверждение вероятной биологической целесообразности повышенной экспрессии ММР у пациентов с МХТ. Угнетения микроциркуляции подтверждено нашими более ранними исследованиями у пациентов с местной холодовой травмой. Установлено, что коллагеназы имеют ингибиторный эффект в отношении воспаления путем процессинга значительного количества хемокинов,

в том числе и провоспалительных интерлейкинов. Вероятно, ингибирующее действие MMP-2 связано с усугубляющейся дисфункцией эндотелия и формированием большого количества неблагоприятных последовательных реакций, формируется своеобразная защитная реакция организма на нарастающее перифокальное воспаление [Н. Yanagisawa, 2013; К. Zafren 2013; S. E. McIntosh et al., 2019; А. Wexler et al., 2017; Н. Nagase et al., 2001].

Установлено, что уровень IL-1, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  в крови повышен во все периоды криоповреждения [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Однако в поздние периоды отморожения уровень провоспалительных интерлейкинов снижается, но по-прежнему остается выше нормальных значений. При этом уровень MMP-9 остается высоким у пациентов и в отдаленные периоды местной холодовой травмы. Синтез этой металлопротеиназы происходит в основном в макрофагах, а также тромбоцитах, реализующих свои функции в интерстиции [Cabral-Pacheco G.A. et al., 2020]. Одной из особенностей MMP-9 является хемотаксис фибробластов в межуточное пространство для реализации процессов репарации. С другой стороны, MMP-9 способствует десмоплазии коллагена. Ремоделирование коллагена в очаге поражения провоцирует дискоординацию пролиферации и, как следствие, затяжное и неблагоприятное течение раневого процесса.

Следовательно, анализ полученных данных позволяет установить, что повышенная экспрессия коллагеназ и их ингибиторов отражает тяжесть, а также особенности течения холодовой травмы, обусловленной дисфункцией эндотелия и формированием фиброза в очаге повреждения и перифокально. Возможно, дисбаланс системы коллагеназ способен вызывать структурно-функциональные изменения экстрацеллюлярного матрикса и клеточных структур, способствуя их патологическому ремоделированию и фиброзу [Н. Yanagisawa, 2013; К. Zafren 2013; S. E. McIntosh et al., 2019; А. Wexler et al., 2017; Н. Nagase et al., 2001; Cabral-Pacheco G.A. et al., 2020].

Выявлено повышение уровня миелопериоксидазы у пациентов с МХТ относительно группы контроля в позднем реактивном периоде. В то же время, у

пациентов в периоде гранулирования и эпителизации уровень МРО снизился по сравнению с показателями содержания МРО в сыворотке у пациентов на 5 сутки, однако оставался выше уровня здоровых людей.

Миелопероксидаза является членом надсемейства гем-пероксидаз, в основном экспрессируется в нейтрофилах и моноцитах. Повышение уровня МРО в циркулирующей крови связано с воспалением и повышенным окислительным стрессом [I. Rashid et al., 2018; B. Shao et al., 2010; B. Zhou et al., 2017; S. Nicholls et al., 2005; E. V. Shamova et al., 2019]. Возрастание уровня МРО в настоящее время трактуется как маркер плохого прогноза и неблагоприятного течения раневого процесса.

В тесной взаимосвязи с миелопероксидазой находится сывороточный кальпротектин, который имеет чрезвычайно большое количество биологических эффектов. L1-протеин относится к семейству лейкоцитарных белков S100, активирующих трансмембранные рецепторы. Сывороточный кальпротектин – внутриклеточный белок фактически всего пула лейкоцитов, в цитозоле которых его содержание значительно и составляет 40–60% общего количества внутриклеточных белков. Как и МРО, кальпротектин оказывает провоспалительное действие на эндотелиоциты, фагоциты *in vitro* и провоцирует развитие воспалительных реакций *in vivo* [I. Rashid et al., 2018; B. Zhou et al., 2017; S. Nicholls et al., 2005; E. V. Shamova et al., 2019]. L1-протеин является драйвером огромного количества важнейших регуляторных функций, таких как хемотаксис, дегрануляция кровяных пластинок, фагоцитоз нейтрофилов, а также ингибирует выработку иммуноглобулинов, ингибирует пролиферацию и дифференцировку клеток, тем самым создавая фундамент для затяжного течения процессов репарации [А.С. Авдеева, 2020; E. V. Shamova et al., 2019].

Наличие поздних осложнений поздних осложнений местной холодовой травмы связано с нарушениями микроциркуляции, в генезе которых существенную роль играют тромбоциты, их гликопротеиновые рецепторы и прочие активирующие трансмембранные белки вещества, такие как

сывороточный кальпротектин и миелопероксидаза [А.С. Авдеева, 2020; E. V. Shamova et al., 2019].

Повышенный уровень МРО и сывороточного кальпротектина может выступать в качестве неблагоприятного предиктора течения любой альтерации по крайней мере по двум причинам. Во-первых, «низкосортное» [S. E. McIntosh et al., 2019; M. L. Wang et al., 2018] воспаление и повышенный окислительный стресс сосуществуют со многими метаболическими нарушениями и сопутствующими заболеваниями, и, следовательно, повышенный уровень данных биологически активных веществ может представлять повышенный сосудисто-метаболический риск в целом. Во-вторых, МРО и кальпротектин являются чрезвычайно высокореактивными субстанциями, которые могут атаковать, разрушать или изменять функцию каждого известного клеточного компонента.

Наиболее распространенными действиями МРО, относящимися к неблагоприятным внутрисосудистым событиям, являются генерация дисфункциональных липопротеинов с повышенным потенциалом атерогенности, сниженной доступностью NO, эндотелиальной дисфункцией, нарушением вазореактивности, нестабильностью атеросклеротической бляшки с перифокальным воспалением и конформацией эритроцитов. Эти действия убедительно свидетельствуют о том, что МРО непосредственно участвует в патофизиологии внутрисосудистых катастроф. В этом отношении МРО можно рассматривать как медиатор или инструмент, с помощью которого воспаление способствует развитию сосудистой патологии на молекулярном и клеточном уровне. Клиническое значение терапевтического ингибирования до настоящего времени не установлено и является перспективным научным направлением.

Известно, что при определенных условиях циркулирующие в кровотоке медиаторы воспаления приводят к чрезмерной активации клеток иммунной системы, в частности, нейтрофильных лейкоцитов, и последующему неконтролируемому выделению биологически активных веществ, в частности, цитокинов и L1-протеина [C. Wagner et al., 2011]. Эти субстанции, выполняя функцию сигнальных молекул, призванных активировать механизмы защиты,

могут выступать в качестве повреждающего фактора и вызывать вторичную альтерацию в уже поврежденных тканях, привлекая новые порции иммунокомпетентных клеток и запуская новый каскад воспаления. Уровень цитокинов значительно повышен во все периоды криотравмы [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Это подтверждает и доказывает факт хронизации эндогенного воспаления у пациентов с местной холодовой травмой. Одновременно создаются предпосылки и к извращенной пролиферации тканей, которая проявляется в виде длительно существующих вялогранулирующих ран у пациентов с отморожениями.

Работами современных ученых показано, что миелопероксидаза влияет на деформируемость эритроцитов, приводя к нарушениям микроциркуляции крови [S. E. McIntosh et al., 2019; M. L. Wang et al., 2018]. Происходит сложный каскад внутриклеточных реакций, ведущий к снижению устойчивости клеток к осмотическому и кислотному гемолизу, снижению эластичности клеток, значительным изменениям объема клеток, морфологии и проводимости ионных каналов плазматической мембраны эритроцитов с неизбежной их конформацией и разрушением, с последующим тромбозом микроциркуляторного русла. Подобный факт дополняет представления о тяжелейшем сбое микроциркуляции при МХТ, которые доказаны в наших ранее проведенных работах [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Разрушенные эритроциты фактически представляют собой тканевой фактор, провоцирующий новый каскад тромбообразования и внутрисосудистого воспаления с дегрануляцией новых порций лейкоцитов.

Также необходимо указать, что активированные в ходе межклеточных взаимодействий лейкоциты способны повреждать клеточную мембрану ввиду активации свободно-радикальных процессов. В частности, миелопероксидаза, выделяемая активными лейкоцитами, способствует образованию в лейкоцитах хлорноватой кислоты и перераспределению активных форм кислорода, усугубляя цитотоксическую активность последних [Б.И. Кузник и соавт., 2014]. Не исключено, что именно подавление гликолиза и метаболический стресс, опосредованно через межклеточные взаимодействия и инкрецию L1-протеина,

запускают каскад патологических процессов у пациентов с местной холодовой травмой, реализуя порочный круг и затяжное, неадекватное течение репаративных процессов.

Следует отметить, что уровень сывороточного кальпротектина не снижается и на 30-е сутки с момента криоповреждения. Следовательно, происходит активация и дегрануляция клеток белой крови. Возможно, данный феномен связан с изменением напряжения сдвига в области пораженной конечности. Так Lee DW et al. (2017) исследовали влияние скорости кровотока на межклеточные взаимодействия. Авторы установили, что тромбоциты, активированные высоким напряжением сдвига, выделяют вещества, способствуя активации и дегрануляции лейкоцитов.

В работах Milenkovic D., Declerck K. (2019) выявлена некоторая взаимосвязь между уровнем эпикотехина и миелопероксидазы. Ученые предположили, что повышение уровня МРО опосредованно провоцирует генетическое перепрограммирование смешанной эндотелиальной клеточной сигнализации и гиперсекрецию эпикотехина, который, как известно, является мощным метаболитом мышечной регенерации, провоцируя гипертонус сосудов и резкое увеличение скоростных показателей кровотока. Факт повышения скоростных показателей кровотока и периферического гипертонуса также подтвержден нами ранее.

Следовательно, повышенный уровень миелопероксидазы и сывороточного кальпротектина – дополнительные составляющие нерешенной проблемы местной холодовой травмы и ее последствий. Уточнение механизмов криодеструкции и последующего неблагоприятного затяжного течения раневого процесса способно оптимизировать подходы к лечению и ускоренной реабилитации пострадавших с отморожениями.

В настоящее время считается, что оксид азота имеет большое значение для поддержания целостности эндотелия, а его гипоинкреция провоцирует изначальную нестабильность клеточной мембраны эндотелиоцита [К.Г.

Шаповалов, 2019; Ю.С. Винник и соавт., 2011, Е.А. Томина и соавт., 2008]. Механизм этого события пока не установлен.

Известно, что уровень NO в крови снижен практически во всех периодах местной холодовой травмы [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. По мнению ряда авторов [Ю.С. Винник и соавт., 2011; Е.А. Томина и соавт., 2008], поврежденный холодом эндотелий утрачивает возможность инкретировать оксид азота. По своей сути эндогенный оксид азота является важнейшим периферическим вазодилататором. Не исключено, что при снижении уровня эндогенного NO уменьшение уровня ADMA является компенсаторным механизмом защиты и попыткой купирования стойкого периферического вазоспазма путем стимуляции, либо снижение обеих вазоактивных молекул – это следствие критической дисфункции эндотелиоцитов, что подтверждается резким повышением уровня слущенных эндотелиальных клеток в кровотоке [Э.Р. Гайнутдинов, 2010].

Оксид азота не только участвует в регуляции тонуса сосудов, но и тормозит агрегацию тромбоцитов, их адгезию к стенкам сосудов, обладает цитотоксическим и рядом других эффектов [Э.Р. Гайнутдинов, 2010; К.Г. Шаповалов, 2019; Ю.С. Винник и соавт., 2011, Е.А. Томина и соавт., 2008; E. Lehmuskallio, 2000]. Следовательно, снижение уровня NO влечет за собой повышение уровня агрегационной активности тромбоцитов и увеличение количества лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, которые мигрируя в межтучное пространство, усиливают интерстициальный отек и провоцируют эндотелиальную дисфункцию как в очаге альтерации, так и перифокально.

Помимо этого, NO имеет прямое влияние на поддержание кровотока путем регуляции мышечного тонуса [К.Г. Шаповалов, 2019; Ю.С. Винник и соавт., 2011, Е.А. Томина и соавт., 2008; E. Lehmuskallio, 2000]. Сосудистый гипертонус у пациентов с местной холодовой травмой подтвержден ранее проведенными исследованиями с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. В работах указано на выраженный дефицит кровенаполнения микроциркуляторного русла, что пагубно влияет на трофику тканей и усугубляет гипоксию тканей.



В последнее время большую роль в нарушении высвобождения оксида азота отводят ингибированию синтазы оксида азота действием асимметричного диметиларгинина, который блокируется естественным субстратом данного фермента — L-аргинином [Э.Р. Гайнутдинов, 2010; E. Lehmuskallio, 2000].

Но как оказалось сравнительно недавно, ADMA имеет гораздо больше клинических эффектов, помимо его влияния на L-аргинин. Резкое повышение уровня ADMA вызывает временное падение частоты сердечных сокращений, сердечного выброса и повышение артериального давления [M. B. Landim et al., 2009]. Мало известно и о потенциальных долгосрочных эффектах повышенного ADMA. Zoccali et al. сообщил, что повышение уровня ADMA в 1,5 раза повышает риск сердечно-сосудистой смертности в 7 раз, а повышение в 2 раза – в 15 раз. Интересно, что недавно был предложен NOS-независимый активирующий эффект ADMA на ангиотензинпревращающий фермент, который, как известно, является доминирующим в ренин-ангиотензиновой системе, оказывающей прямое действие на метаболизм в сосудистой стенке.

Показано, что увеличение концентрации ADMA приводит к значительному снижению выработки NO [M. B. Landim et al., 2009; О.Е. Анциферова и соавт., 2018]. Формирующаяся эндотелий-зависимая вазоконстрикция лежит в основе патогенеза многих заболеваний, в частности сахарного диабета, артериальной гипертензии, почечной недостаточности, осложненного акушерства. [M. B. Landim et al., 2009; О.Е. Анциферова и соавт., 2018]. В когорте пациентов с гемодиализом обнаружили, что ADMA может быть сильным и независимым фактором риска общей смертности и сердечно-сосудистых катастроф [Guo W et al., 2014]. В настоящее время взгляды на метаболизм асимметричного диметиларгинина претерпевают значительные изменения.

При анализе полученных результатов отмечается значительное снижение ADMA в сыворотке крови у пациентов с местной холодовой травмой в раннем реактивном периоде по сравнению с контрольной группой. При этом содержание ADMA в сыворотке снижено и на 30 сутки с момента криоповреждения.

Подобный феномен, вероятно, связан со стойким периферическим вазоспазмом, дефицитом NO-зависимых механизмов вазодилатации и вероятной гибелью эндотелиальной выстилки в очаге альтерации и окружающих тканях. Факт выраженной деструкции эндотелиоцитов подтверждают и выполненные ранее работы, установившие значительно повышение содержания цитокинов в периферической крови [Е.А. Томина и соавт., 2008]. Последние, как известно, в значительных концентрациях имеют выраженный опосредованный цитотоксический эффект [М. В. Landim et al., 2009; О.Е. Анциферова и соавт., 2018; Guo W et al., 2014].

Отмечено достоверное снижение уровня асимметричного диметиларгинина в крови у пациентов с тяжелой местной холодовой травмой, а именно у пострадавших с отморожениями всей стопы и дистальных сегментов голени. У пациентов с отморожениями пальцев уровень ADMA не изменялся.

После восстановления кровотока в поврежденных сегментах конечностей ЦЭК в большом количестве выбрасывались в системный кровоток. Кроме того, неравномерное повышение температуры сопровождалось гипоксией и дегрануляцией новых порций тромбоцитов. Помимо этого, патологическая болевая импульсация провоцирует инкрецию значительного количества катехоламинов и прочих стресс-гормонов.

В более поздние сроки криотравмы, а именно на 30 сутки, происходило отграничение очага альтерации, а также выполнялись некрэктомии, экзартикуляции и ампутации сегментов конечностей, при этом снижался объем поврежденных тканей, что нашло свое подтверждение и в уменьшении количества ЦЭК.

Вероятно, увеличение объема поврежденных тканей провоцирует значительное повреждение сосудистой стенки, гибель эндотелиоцитов и обнажение субэндотелиального матрикса. В ответ на это активируется все большее количество тромбоцитов, которые реализуют процессы воспаления и привлекают в очаг альтерации иммунокомпетентные клетки. Тромбоциты выделяют тромбоксан A<sub>2</sub>, являющийся мощнейшим вазоконстриктором.

Процессы периферического вазоспазма еще больше усугубляются. Снижение уровня ADMA у пациентов с выраженной площадью альтерации, вероятно, опять-таки является механизмом стабилизации периферического вазоспазма и усугубляющейся ишемии путем попытки косвенной провокации синтеза оксида азота, хотя его уровень снижен во все периоды криповреждения. Однако некоторые авторы предполагают, что существуют механизмы, с помощью которых низкие концентрации NO и ADMA оказывают неблагоприятное воздействие на сосудистую систему [Guo W et al., 2014]. Не исключено, что влияние ADMA на ангиотензипревращающий фермент провоцирует аккумуляцию бета-амилоидных бляшек в субэндотелиальном матриксе, что ведет к дезорганизации клеточной мембраны и хронизации процессов воспаления.

Сниженный уровень ADMA, возможно, связан и с включающимися механизмами стабилизации после альтерации и попытками организма способствовать эндотелий-зависимой вазодилатации путем ингибирования инкреции одного из внутриклеточных супрессоров оксида азота. Данный факт опровергает общепринятое мнение об основополагающей роли гиперсекреции ADMA в реализации эндотелий-зависимой вазоконстрикции [Guo W et al., 2014]. Ранее доказано, что у пациентов с местной холодовой травмой уровень вазодилатирующих нитритов значительно ниже нормы [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008]. Это указывает на стойкую вазоконстрикцию у пострадавших и во многом объясняет неблагоприятные исходы криповреждения. Не исключается и эндотелиальный цитолиз, способствующий уменьшению его инкреторной активности (Рисунок 15).

Комплексный анализ концентрации молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина является надежным методом выявления эндотелиальной дисфункции [Ю.С. Винник и соавт., 2011], а также ранней диагностики уровня поражения дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме, что позволяет сформировать представления о процессе восстановления в динамике.

Холодовая альтерация провоцирует серьезный патологический дисбаланс

(дисфункцию) как в инкреторной активности эндотелия, так и на поверхности мембраны эндотелиоцитов, что также играет чрезвычайно важную роль в поддержании гомеостаза [Ю.С. Винник и соавт., 2011; J. A. McMahon, 2012; Z. Keshavarzi et al., 2019]. Под дисфункцией эндотелия понимают нарушение выработки вазодилатирующих и вазоконстрикторных медиаторов, а также патологическую экспрессию адгезивных молекул на поверхности клеточной мембраны. Необходимо отметить, что молекулы адгезии в условиях физиологии практически отсутствуют на поверхности эндотелия [Л.В. Васина и соавт., 2017]. Их экспрессия инициируется цитокинами, которые резко повышены при холодной альтерации [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008; M. Brunet, 2012; J. M. Piquegas et al., 2004], а также нарушением скоростных показателей кровотока и повреждением субэндотелиального матрикса. Процессы адгезии начинаются с торможения роллинга лейкоцитов по поверхности эндотелия [Б.И. Кузник и соавт., 2014].

Начальным этапом этого процесса выступают именно растворимые формы селектинов (sE-SEL и sP-SEL). В работах китайских ученых относительно остеорепарации показана роль этих белков в неблагоприятном течение процессов заживления в связи наличием затяжного воспаления [L. Kong et al., 2019]. Суперсемейство иммуноглобулинов (ICAM-1, VCAM) имеют сродство к интегральным белкам лейкоцитов подсемейства  $\beta 2$  (LFA и CR3). Посредством этих белков окончательно прекращается роллинг лейкоцитов и реализуется описанный ранее феномен лейкоцитарно-тромбоцитарной адгезии с проникновением коагратов в интерстициальное пространство (рисунок 14). Немногочисленные работы современных ученых также показали неблагоприятное течение раневого процесса при избыточном содержании растворимых форм суперсемейства иммуноглобулинов в периферической крови [С. Н. Lee et al., 2019; L. Kong, 2019].

Особая роль в современной литературе отводится суперсемейству кадгеринов, а именно домену CD40 - CD40L. Интерес к этим белкам обусловлен тем, что фосфопротеин CD40 экспрессируется на поверхности практически всех

«параэндотелиальных» клеток. По своей структуре CD40 гомологичен FAS-рецептору лейкоцитов и у него отсутствует «домен смерти». Избыточная экспрессия CD40 провоцирует затяжное течение процессов воспаления в очаге альтерации и, нередко, приводит к хронизации заболевания [J.L. Karnell et al., 2019].

Клеточно-клеточные взаимодействия и клеточная адгезия являются ключевыми медиаторами прогрессирования воспаления. Многие молекулы клеточной адгезии, в частности ICAM–1, VCAM, CD40L и селектины различных субпопуляций в ходе альтерации видоизменяются, и наблюдаются значительные изменения гликозилирования. Конформированные молекулы клеточной адгезии изменяют способность клеток взаимодействовать с другими клетками и белками внеклеточного матрикса [Ю.С. Винник и соавт., 2011; A. Tampakis et al., 2019].

Возможно, что полученные нами результаты фиксируют не «оригинальные» адгезивные молекулы, а именно видоизмененные, провоцирующий затяжной патологический каскад межклеточных взаимодействий, что влечет за собой извращение финальной стадии воспаления. Факт их экспрессии длительное время подтверждает эту гипотезу. Следовательно, не разорвав эти постоянно формирующиеся патологические связи, невозможно адекватно профилактировать и лечить осложнения как криповреждения, так и любой другой интраваскулярной патологии. Современные научные работы, изучающие онкозаболевания, атеросклероз и аллергические реакции, подтверждают наше предположение [M. V. Landim et al., 2009; H. Läubli et al., 2019]. В данных работах ведется обсуждение фокусирования на механизмах иммунного уклонения, которые могут быть терапевтически нацелены на блок этих межклеточных взаимодействий.

В частности, настоящее время ведутся работы по изучению антагонистов адгезивных белков, так называемых анти-интегриновые антитела, блокирующие межклеточный трафик и провоцирующие роллинг лейкоцитов. Эти биологически активные соединения получили название «ингибиторы JAK», ввиду того что угнетают сравнительно недавно изученный Jak-STAT путь лейкоцитов, суть

которого заключается в блокировании и трансформации сфингозин-1-фосфата-рецептора лейкоцитов и эндотелия [M. M. Hanlon et al., 2019; P. Schreiner et al., 2019]. В своей работе ученые доказали существенное патогенетическое значение адгезивных белков. Не исключено, что установленные способы воздействия на молекулы межклеточной адгезии существенно расширят и изменят особенности терапии многих заболеваний, связанных с дисфункцией эндотелия.

В тесном контакте с адгезивными молекулами находятся и вазоактивные вещества, выделяемые эндотелием [Ю.С. Винник и соавт., 2011].

Вазоактивная эндотелиальная дисфункция, связанная с нарушением инкреции оксида азота, представляет собой начальное проявление нарушения жизнедеятельности эндотелиоцита, являющееся в последующем одной из основных составляющих в патогенезе гипертонической болезни, ИБС, тромботических осложнений, а также местной холодовой травмы [M. M. Tuscureanu M.M. et al., 2019; Morrow D. A. et al., 2008; Рахиджанова М.Т. и соавт, 2014; Руюткина Л.А. и соавт., 2018; Bhokta N.R. et al., 2011; O. Henriksson et al., 2015; M. Catalfamo, 2012].

Эндотелий принимает самое активное участие в регуляции сосудистого тонуса, инкретируя, в частности, оксид азота (NO) и его производные [Е. А. Томина и соавт., 2008; С. Bogdan, 2001]. В ранние сроки криотравмы из-за замедления кровотока и уменьшения инкреции продуктов альтерации в кровотоке значения нитритов приближены к значениям контроля. В более поздние сроки концентрация уменьшается в 1,5 раза. Вероятно, это фактор ангиоспазма и следствие ингибиции поврежденных эндотелиальных клеток инкретировать нитриты [Ю.С. Винник и соавт, 2014].

Снижение уровня NO в крови приводит к вазоконстрикции. Установлено, что ангиоспазм при отморожениях продолжителен, сохраняется до 3 недель и в последующем приводит к деградациии пролиферативных процессов в сосудистой стенке, которые являются пусковым моментом развития облитерирующего эндартериита [S. Della Bella et al., 2001]. Следовательно, концентрация нитритов максимально снижена в позднем реактивном периоде и является основным

прогностическим маркером затяжного и извращенного течения репарации процессов при отморожениях [К.Г. Шаповалов и соавт., 2008].

Tom Theruvath и John Lemasters (2016) подробно изучили особенности метаболизма eNOS у пациентов с местной холодовой травмой в условиях органодонорства. Авторы обнаружили, что дефицит данного фермента усугубляет реперфузию тканей форменными элементами крови, в частности лейкоцитами, способствуя повышению некроза и апоптоза, и, как следствие, нарушению микроциркуляции в поврежденных тканях. Исследования ряда авторов подтверждают, что постхолодовая инфильтрация лейкоцитами поврежденных участков на фоне дефицита eNOS способствуют усилению и прогрессированию ишемии и некроза тканей [Ю.С. Винник и соавт., 2011].

Нарушение продукции нитритов может возникать в связи с кумуляцией эндогенных конкурентных ингибиторов в эндотелиоците. В связи с этим нарушение эндотелиальной вазодилатации является одним из основных эффектов, реализующихся при накоплении асимметричного диметиларгинина в организме. В большинстве случаев торможение eNOS под влиянием возникает за счет асимметричного диметиларгинина, накапливающегося в эндотелиоцитах [Hong F.F et al., 2019]. Показано, что у лиц, страдающих от внутрисосудистых катастроф различного генеза, осложненного сахарного диабета, осложненном акушерстве уровень ADMA достигает высоких значений [М. В. Landim et al., 2009; О.Е. Анциферова и соавт., 2018; С. Zoccali et al., 2001; А, Burska, 2014]. Именно повышенным уровнем ADMA авторы объясняют стойкую дисфункцию эндотелия у больных.

Современные исследования выявили неоднозначную биологическую роль ICAM-1 и VCAM [Ю.С. Винник и соавт., 2011]. В конце 20 века были выявлены преимущественно растворимые формы этих молекул, свободно циркулирующие в кровотоке. Их образование ассоциировали с повреждением активированного эндотелия.

В настоящий момент в мировой научной практике широко обсуждается вопрос об остеотоксичности суперсемейства ICAM. Данный иммуноглобулин

может обладать двойными эффектами на остеокластогенез, непосредственно влияя на адгезию зрелого остеокласта и косвенно участвуя в дифференцировке RANKL / RANK индуцированных остеокластических предшественников, однако эти результаты требуют уточнения, но дальнейшее изучение роли ICAM-1, безусловно, обеспечит перспективные направления и позволит определить терапевтические мишени для лечения неблагоприятных последствий альтерации, в том числе и при местной холодовой травме [Sobacchi C et al., 2019]. Необходимо отметить, что у пациентов с перенесенной местной холодовой травмой процессы репарации крайне снижены, в том числе и костной ткани. Посттравматический остеомиелит встречается фактически в 90% случаев [В.А. Сизоненко и соавт., 2003]. Возможно, повышенное содержание уровня адгезивных молекул суперсемейства иммуноглобулинов провоцируют дезорганизацию костной ткани и остеомиелит у пострадавших с местной холодовой травмой.

Необходимо отметить, что максимальное содержание адгезивных молекул в сыворотке пострадавших наблюдается на 5 сутки и у пациентов с самыми тяжелыми отморожения. По данным Blankenberg и соавт. повышенное содержание sVCAM-1 у больных с ИБС является предиктором неблагоприятного течения заболевания и создает предпосылки для фатальных кардиоваскулярных событий. Vuop и соавт. также указали на то, что повышенный уровень растворимых форм адгезивных молекул являются предиктором неблагоприятного течения генерализованного атеросклероза с хронизацией процесса.

Однако мы склонны считать, 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 (Рисунок 15).

Проблема прогноза исходов холодовой травмы является одной из самых актуальных в современной термической травме. Частота постальтерационных осложнений при местной холодовой травме варьирует от 23,5 до 35% [Винник Ю.С. и соавт. 2011; Хапкина А.В. и соавт. 2017; Томина Е.А. и соавт. 2008; Цхай



В.Ф. и соавт 2013; Bruen K.J. et al. 2007]. При сопутствующей патологии кровообращения и иннервации (нейроваскулит, облитерирующие заболевания сосудов, сахарный диабет, травмы и т.д.) объём поражения, а также длительность течения раневого процесса увеличиваются. На первое место в структуре осложнений выходят несостоятельность культи после оперативного лечения, нагноение послеоперационных ран, холодовой нейроваскулит с трофическими нарушениями дистальных сегментов конечностей. На ранних сроках травмы не всегда удастся определить точную зону демаркации, поэтому прогноз, как правило, не ясен.

Для упрощения и повышения точности прогнозирования течения раневого процесса при местной холодовой травме III – IV степени дистальных сегментов нижних конечностей проводят электронейромиографию пораженной конечности, определяют амплитуду М-ответа, рассчитывают коэффициент развития послеоперационных осложнений по формуле:  $K = 1,7 \times АМА - 0,65$ , где АМА – амплитуда М-ответа (мВ), 0,65 - константа уравнения линейной регрессии, 1,7 - коэффициент уравнения линейной регрессии, и при значении коэффициента К менее 1,0 – прогнозируют осложненное течение раневого процесса в послеоперационном периоде.

Выбор критериев проведен на основании оценки зависимости течения раневого процесса от общего числа определенных параметров электронейромиографии (амплитуда М-ответа, резидуальная латентность, скорость распространения возбуждения) нижних конечностей по данным построения математической модели, основанной на методах линейной регрессии [T. Lang et al., 2014].

В настоящее время электронейромиография (ЭНМГ) является единственным объективным методом оценки функционального состояния периферической нервной ткани. Данный способ доказал свою клиническую эффективность при большинстве заболеваний, сопровождающихся дегенерацией периферических нервов, что позволяет прогнозировать осложненное течение раневого процесса в

послеоперационном периоде, так и неблагоприятного течения ран при любой патологии [А.Г. Ремнев, 2013]. Ранний прогноз позволяет своевременно выполнить коррекцию лечения и способствует предотвращению развития осложнений в послеоперационном периоде у пациентов с местной холодовой травмой.

Для повышения точности прогноза течения раневого процесса при местной холодовой травме и вычисляют коэффициент К по формуле:  $K = 1,7 \times АМА - 0,65$ , где АМА – амплитуда М-ответа (мВ), 0,65 - константа уравнения линейной регрессии, 1,7 - коэффициент уравнения линейной регрессии, и при коэффициенте К менее 1,0 прогнозируют осложненное течение раневого процесса в послеоперационном периоде.

Чрезвычайно актуальным является ранний прогноз уровня холодовой травмы, который позволяет своевременно определить условную линию демаркации. Раннее прогнозирование позволяет планировать сроки и объем необходимого лечения, и как следствие, профилактирует развитие послеоперационных осложнений. Известно, что в начальном периоде отморожения определить уровень повреждения тканей не представляется возможным. Отсутствие зоны демаркации создает определенные сложности в определении объема проводимой терапии и прогнозе дальнейшего течения повреждения. Ситуация отягощается достаточно частым наличием сопутствующей патологии кровообращения и иннервации тканей [М. А. Khanday et al., 2015; J. J. Knapik et al., 2020; K. W. Russell et al., 2013; С. F. Kingma et al., 2019]. В связи с этим частота неблагоприятного течения раневого процесса при местной холодовой травме достигает порядка 35-40%. Это связано с выбором неадекватного уровня ампутации, ввиду регионарной эндотелиальной дисфункции и тяжелого нарушения периферической иннервации, которые провоцируют увеличение зоны паранекроза значительно выше видимого повреждения.

Для повышения точности и упрощения способа прогнозирования уровня повреждения при местной холодовой травме III–IV степени дистальных сегментов нижних конечностей проводят электронейромиографию пораженной

конечности и рассчитывают коэффициент уровня повреждения по формуле:  $K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL$ , где: SEP - скорость распространения возбуждения (мС), AMR - амплитуда М-ответа (мВ), RL - резидуальная латентность (мС); 1,5 – константа уравнения линейной регрессии; 0,04, 0,15, 0,355 – коэффициенты уравнения линейной регрессии. При значении К менее 2 прогнозируют отморожение на уровне пальцев стопы, при К от 2 до 3 – на уровне предплюсно-плюсневого сочленения, при К более 3 – тотальное поражение стопы.

Таким образом, использование метода ЭНМГ позволяло прогнозировать течение раневого процесса и уровня повреждения при местной холодовой травме конечностей.

Существующие в настоящее время классификационные критерии основаны на этиологии, сроках и глубине холодового повреждения и не содержат признаков, определяющих наличие и характер ранних и поздних осложнений отморожений, а также особенностей клинического течения последствий криповреждения [В.А. Сизоненко и соавт., 2003].

Все более существенным аспектом становится справедливый расчет стоимости лечения пациентов в системе обязательного медицинского страхования. В соответствии, разработка новых способов классификации с учетом этиопатогенетических механизмов формирования осложнений при криотравме травмы является интересной как с теоретической, так и с организационно-экономической точки зрения.

В ходе создания нового варианта классификации осложнений местной холодовой травмы нами выбраны следующие критерии: снижение чувствительности, судороги, нарушение координации движений, наличие трофических нарушений, вторичные признаки ишемизации конечности, отсутствие пульсации на магистральных сосудах, УЗДГ-признаки нарушений кровотока, ЭНМГ-признаки нарушений иннервации критерии, которые составляют подавляющее большинство возможных постальтерационных осложнений у пациентов с местной холодовой травмой. В настоящее время их использование в конкретных случаях необходимо ввиду своевременной

коррекции «диагноз-ассоциированного» лечения, а также позволит более корректно и правильно уточнить экономическую составляющую терапии данной социально значимой проблемы.

Установлено, что у больных в подавляющем большинстве случаев выявляются снижение чувствительности, дискоординация мышечной деятельности, судороги. Эти явления связаны с нарушением иннервации пораженного сегмента конечности. Доказано, что даже после отморожений II степени формируются невриты, нейроваскулиты, окклюзирующие заболевания артерий нижних конечностей и трофические изменения дистальных сегментов стоп [J. J. Knapik et al., 2020; K. W. Russell et al., 2013; C. F. Kingma et al., 2019]. Они с трудом поддаются лечению, а в послеоперационном периоде при поражении III-IV степени часто отмечаются нагноения мягких тканей культи, вторичный некроз. Эти осложнения зачастую ведут к септическим осложнениям и протяженным тромбозам. При нарушениях чувствительной иннервации после локальной криотравмы неизбежно разобщение между потребностями тканей в трофике и оценке организмом этого процесса с неблагоприятными последствиями. Нарушения симпатической иннервации – это путь к дистрофии тканей с образованием трофических нарушений, что так же отмечено у наших пациентов (Рисунок 15). Формируется нейропатическая форма холодовой конечности.

Частными осложнениями у пациентов с местной холодовой травмой являются нарушения регионарного кровотока, который провоцирует в формирование ишемической формы холодовой конечности. У этих пациентов отсутствует магистральный кровоток на стопе и определяются вторичные признаки ишемического поражения кожи: отсутствие волосяного покрова, бледность кожи и ломкость ногтей. В случаях выраженного артериального дефицита возможны трофические нарушения и гангрена культи пораженной конечности. В немногочисленных исследованиях, касающихся изучения микроциркуляции с помощью лазерной доплеровской флоуметрии у пациентов с местной холодовой травмой, показано, что комплексное нарушение кровотока в очаге альтерации и перифокально является важным звеном осложнений местной холодовой травмы с

формированием ишемической формы холодовой конечности [К.Г. Шаповалов и соавт., 2003].

У пострадавших с криоповреждением выявлялись признаки, свойственные и для поражения периферических нервов, и для дефицита регионарного кровоснабжения [K. W. Russell et al., 2013; C. F. Kingma et al., 2019]. Эти критерии сформированы в отдельную смешанную форму холодовой конечности. Вероятно, подобное явление связано с комплексным поражением сосудисто-нервного пучка, а превалирование отдельных форм может объясняться преморбидными изменениями периферической нервной или, реже, сосудистой системы.

Предлагаемый способ классификации осложнений местной холодовой травмы имеет патогенетическое, методическое и организационно-экономическое значение.

Учитывая результаты исследования, можно сделать вывод о том, что «хроническая» эндотелиальная дисфункция – одно из базисных составляющих тяжелых, устойчивых к терапии последствий как местной холодовой травмы, так и многих других интраваскулярных катастроф. Повышенный уровень содержания молекул межклеточной адгезии наряду со снижением уровня асимметричного диметиларгинина, изменение инкреторной активности эндотелия, трансформированные межклеточные взаимодействия и диагностированные инструментальные отклонения свидетельствуют не только о факте криотравмы, но и в перспективе могут стать инструментом ранней диагностики уровня криоповреждения. Коррекция тактики ведения подобных пациентов гипотетически позволит не только улучшить общее состояние пациентов и прогноз, но и минимизировать объем необходимого оперативного пособия

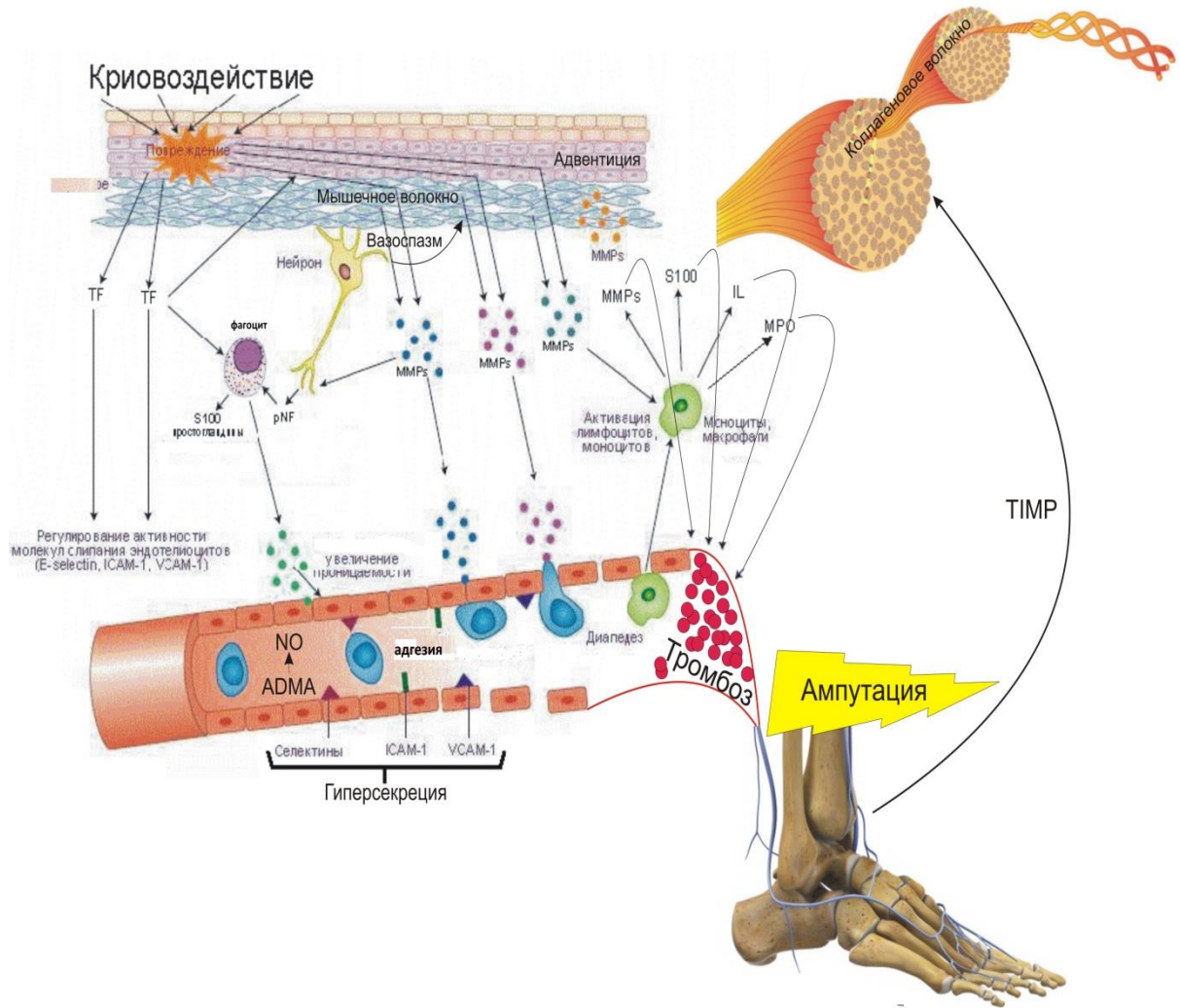


Рисунок 15 - концепция патогенеза криповреждения

- ADMA – асимметричный диметиларгенин,
- E-selectin – лейкоцитарная молекула клеточной адгезии,
- ICAM – эндотелиальная молекула межклеточной адгезии,
- MMP – матриксные металлопротеиназы,
- MPO – миелопероксидаза,
- VCAM – молекула межклеточной адгезии суперсемейства иммуноглобулинов,
- NO – оксид азота,
- TIMP – ингибиторы матриксных металлопротеиназ,
- S100AB – белок Мооре,
- pNF – периферический нейрофиламент,
- TF – тканевой фактор.

## ВЫВОДЫ

1. При отморожениях отмечается снижение биоэлектрической активности мышц конечности проксимальнее зоны поражения. В ранние сроки значительно снижается амплитуда М-ответа и скорость распространения возбуждения, при этом резидуальная латентность повышается. В динамике отмечается тенденция к восстановлению уровня биоэлектрической активности мышц.
2. У пострадавших с отморожениями III-IV степени в крови выявлено резкое повышение фосфорилированного периферического нейрофиламента и сывороточного кальпротектина. Максимальная концентрация нейрофиламента-N зафиксирована в ранние сроки криоповреждения; в поздние сроки отмечена тенденция к снижению уровня периферического нейрофиламента. Повышенное содержание L-протеина сохраняется и в поздние сроки криотравмы; тенденции к снижению концентрации L-протеина не зафиксировано.
3. На фоне криотравмы увеличивается активность нейрогенного компонента регуляции сосудистого тонуса, уменьшается микроциркуляторный кровоток. Отклонения показателей микроциркуляции усугубляются с увеличением массива пораженных тканей и не зависят от периода криоповреждения.
4. Выявлено, что при отморожениях в крови возрастает уровень матриксных металлопротеиназ 2 и 9. Увеличение концентрации коллагеназ в сыворотке крови пострадавших прямо пропорционально тяжести травмы. Содержание ингибиторов коллагеназ значительно увеличено во все периоды отморожения и не зависит от тяжести криотравмы.
5. У пациентов с отморожениями содержание оксида азота и асимметричного диметиларгинина в кровотоке определяется тяжестью криоповреждения. Объем пораженных холодом тканей прямо пропорционален уровню циркулирующих эндотелиальных клеток в сыворотке пострадавших. В поздние сроки с момента травмы уровень циркулирующих эндотелиальных клеток не отличается от показателей контроля.

6. При отморожениях отмечается стойкое повышение адгезивной способности лимфоцитов с тромбоцитами, возрастание уровня миелопероксидазы и содержания молекул межклеточной адгезии.
7. На основе динамики количества лимфоцитарно-пластинчатых коагрегатов, изменений показателей электронейромиографических потенциалов, а также уровня молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина сформулированы патофизиологические модели прогнозирования уровня повреждения тканей и тяжести криоповреждения.
8. Разработана классификация осложнений криоповреждения, позволяющая рубрифицировать последние на ранние и поздние. Предлагаемый способ классификации имеет патогенетическое, методическое и организационно-экономическое значение.



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с отморожениями конечностей III-IV степени для прогнозирования уровня повреждения тканей и развития осложнений предлагается проводить накожную стимуляционную электронейромиографию пораженной конечности и рассчитывать:

- коэффициент уровня повреждения по формуле:  $K = 1,5 - 0,04 \times SEP - 0,15 \times AMR + 0,355 \times RL$ , где: SEP - скорость распространения возбуждения, AMR - амплитуда М-ответа, RL - резидуальная латентность; 1,5 – константа уравнения линейной регрессии; 0,04, 0,15, 0,355 – коэффициенты уравнения линейной регрессии, при значении K менее 2 прогнозируют отморожение на уровне пальцев стопы, при K от 2 до 3 – на уровне предплюсно-плюсневого сочленения, при K более 3 – тотальное поражение стопы.

- коэффициент развития осложнений по формуле:  $K = 1,7 \times АМА - 0,65$ , где: АМА – амплитуда М-ответа, 0,65 - константа уравнения линейной регрессии, 1,7 - коэффициент уравнения линейной регрессии, и при коэффициенте K менее 1,0 прогнозируют развитие осложнений.

2. Сформирована концептуальная классификация осложнений местной холодовой травмы. Выделены ранние и поздние осложнения при глубоких отморожениях. В ранние сроки криоповреждения у пострадавших наиболее часто выявляются нарушения чувствительности пораженной конечности (100%), судороги (87%), нарушение координации движений (100%), а также отторжение трансплантата (12,5%), нагноение, несостоятельность швов (15,6%) и формирование некроза культи (6,3%). В поздние сроки возможны трофические нарушения (32%), остеомиелит (28%) и гангрена дистального сегмента пораженной конечности (12%).

3. При раннем прогнозировании объема пораженных тканей рекомендуется заранее извещать пациентов о предстоящей инвалидизации, последующих этапах реабилитации и изменении качества жизни пострадавших.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

A(n) – максимальные амплитуды колебаний нейрогенного диапазона,

aMo – амплитуда моторного ответа,

мС – миллисекунд,

мВ – милливольт,

ИФА – иммуноферментный анализ,

КРБС – комплексный регионарный болевой синдром,

ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия,

ЛТА – лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия,

МНО - международное нормализованное отношение,

ПГЭ – период гранулирования и эпителизации,

ПМ - показатель микроциркуляции,

ПРП – поздний реактивный период,

ПШ – показатель шунтирования,

РЛ – резидуальная латентность,

СРВ – скорость распространения возбуждения,

ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки,

ЭНМГ – электронейромиография,

ADMA – асимметричный диметиларгенин,

IL- интерлейкин,

ММР – матриксные металлопротеиназы,

МРО – миелопероксидаза,

MPR 8/14 – сывороточный кальпротектин,

NO – оксид азота,

TIMP – ингибиторы матриксных металлопротеиназ,

pNF-H – периферический нейрофиламент H.

**ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ  
НАУЧНЫЕ РАБОТЫ**

1. Пат. **2704785 РФ**, С1 А 61В 5/04. Способ прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III-IV степени дистальных сегментов нижних конечностей / Михайличенко М.И., К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров. - № 2019108730; заявл. 26.03.2019; опубл. 30.10.2019, Бюл. № 31.
2. Пат. **2712572 РФ**, С1 А 61В 5/04. Способ прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме нижних конечностей / Михайличенко М.И., К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров. - № 2019102995; заявл. 04.02.2019; опубл. 29.01.2020, Бюл. № 4.
3. Пат. **2345713 РФ**, С1 А 61В 8/06. Способ прогнозирования течения раневого процесса при глубоких отморожениях нижних конечностей / Шаповалов К.Г., Сизоненко В.А., Михайличенко М.И., Томина Е.А. - № 2007121162; заявл. 05.06.2007; опубл. 10.02.2009, Бюл. № 4. – 6 с.
4. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ **2019666297** Российская Федерация. Программа для прогнозирования уровня поражения дистальных сегментов нижних конечностей при местной холодовой травме III – IV степени / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия». - № 2019664994 ; заявл. 21 ноября 2019 ; опубл. 6 декабря 2019. – 1 с.
5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ **2019612961** Российская Федерация. Программа для ранней диагностики уровня поражения дистальных сегментов конечностей при местной холодовой травме III – IV степени / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия». - № 2019612961; заявл. 21 февраля 2019; опубл. 5 марта 2019. – 1 с.

6. **Михайличенко, М.И.** Классификация осложнений местной холодовой травмы / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров // **Вестник хирургии имени И. И. Грекова.** – 2021. - №2. – С. 37–41. DOI: 10.24884/0042-4625-2021-180-2-37-41. [Scopus].

7. **Михайличенко, М.И.** Динамика нейромышечной активности у пациентов с местной холодовой травмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // **Вестник хирургии имени И. И. Грекова.** - 2019. - №5. – С. 47–51. DOI: 10.24884/0042-4625-2019-178-5-47-51. [Scopus].

8. **Михайличенко, М.И.** Прогнозирование осложнений у пациентов с местной холодовой травмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров // **Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.** – 2020. - №2. – С. 92-97.

9. **Михайличенко, М.И.** Периферическая нейродеструкция у пациентов с местной холодовой травмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // **Новости хирургии.** – 2020. - №4. – С. 536-542. DOI: 10.18484/2305-0047.2020.4.536. [Scopus].

10. **Михайличенко, М.И.** Патогенетическое значение дисфункции эндотелия в формировании гипертонуса периферической сосудистой стенки при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2020. - №4. – С. – 54-61. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.54-61.

11. **Михайличенко, М.И.** Комплексная оценка периферической иннервации и изменений колебаний микрокровотока при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2021. - №2. – С. 78-84. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.02.78-84

12. **Михайличенко, М.И.** 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. №2. – С. 11-17. DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-11-17.
13. Михайличенко, М.И. Микроциркуляторные нарушения в патогенезе местной холодовой травмы / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов // **Регионарное кровообращение и микроциркуляция.** – 2019. - №2. – С. 4-11. DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-2-4-11. (Обзорная статья).
14. Михайличенко, М.И. Динамика уровня миелопероксидазы и сывороточного кальпротектина при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров // **Acta biomedica scientifica.** – 2020. - №3. – С. 24-28. DOI: 10.29413/ABS.2020-5.3.3. [Scopus].
15. Михайличенко, М.И. Динамика матриксных металлопротеиназ при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // **Acta biomedica scientifica.** – 2019. - №5. – С. 79-83. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.13. [Scopus].
16. Михайличенко, М.И. Влияние кальпротектина на активность межклеточных взаимодействий при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров // **Сибирское медицинское обозрение.** – 2020. - №2. – С. 74-79. DOI: 10.20333/2500136-2020-2-74-79. [Scopus].
17. Михайличенко, М.И. Значение матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в течении раневого процесса при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] // **Якутский медицинский журнал.** – 2019. - №2. С. 72-77. DOI: 10.25789/YMJ.2020.70.22. [Web of Science].
18. 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 // **Дальневосточный медицинский журнал.** - 2020. - №4. – С. 5-10. DOI: 10.35177/1994-5191-2020-4-5-10.

19. **Михайличенко, М.И.** Изменение уровня молекул межклеточной адгезии и асимметричного 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. DOI: 10.25555/THR.2021.2.0976. [**Scopus**].
20. **Михайличенко, М.И.** Агрегация тромбоцитов у больных с местной холодовой травмой на фоне внутриартериального введения гепарина / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, Ю.А. Витковский [и др.] // **Актуальные вопросы интенсивной терапии.** – 2008. - №1. – С. 25-27.
21. **Михайличенко, М.И.** Коррекция состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при отморожениях конечностей / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Иванов [и др.] // **Acta biomedica Scientifica.** – 2008. - №3. – С. 118-119. [**Scopus**].
22. **Михайличенко, М.И.** Роль лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, цитокинов и эндотелиальной дисфункции в патогенезе повреждения холодом / К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко, Ю.А. Витковский // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2009. - №1. – С. 39-40.
23. **Михайличенко, М.И.** Уровень цитокинов в крови больных с различной тяжестью местной холодовой травмы / К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко, В.А. Иванов [и др.] // **Российский иммунологический журнал.** – 2008. - №2. – С. 117-122.
24. **Михайличенко, М.И.** Функциональное состояние тромбоцитов при местных холодовых поражениях / К.Г. Шаповалов, В.А. Сизоненко, М.И. Михайличенко [и др.] // **Казанский медицинский журнал.** – 2008. - №5. – С. 662-665. [**Scopus**].
25. **Михайличенко, М.И.** Содержание цитокинов в жидкости пузырей, крови и субпопуляции лимфоцитов при местной холодовой травме / К.Г. Шаповалов, В.А. Иванов, М.И. Михайличенко [и др.] // **Иммунология.** – 2008. - №3. – С. 170-172. [**Scopus**].
26. **Михайличенко, М.И.** Особенности экспрессии тканевого фактора моноцитами периферической крови при холодовом повреждении / К.Г.

Шаповалов, В.А. Иванов, М.И. Михайличенко [и др.]// **Дальневосточный медицинский журнал.** – 2008. - №3. – С. 42-44.

27. **Михайличенко, М.И.** Повреждение клеток эндотелия и динамика цитокинов у больных в разные периоды местной холодовой травмы / К.Г. Шаповалов, Е.А. Томина, М.И. Михайличенко [и др.] // **Травматология и ортопедия России.** – 2008. - №1. – С. 35-37. [Scopus].

28. **Михайличенко, М.И.** Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме / К.Г. Шаповалов, Е.А. Томина, М.И. Михайличенко [и др.] // **Медицинская иммунология.** – 2008. - №1. – С. 89-92. [Scopus].

29. **Михайличенко, М.И.** Изменения агрегационных свойств тромбоцитов у больных с местной холодовой травмой / К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко, В.А. Иванов // **Дальневосточный медицинский журнал.** – 2007. - №4. – С. 33-35.

30. **Михайличенко, М.И.** Современные аспекты организации помощи больным с местной холодовой травмой верхних конечностей / К.Г. Шаповалов, В.А. Сизоненко, М.И. Михайличенко // **Травматология и ортопедия России.** – 2008. - №2. – С. 88-89. [Scopus].

31. **Михайличенко, М.И.** Оценка эффективности проводниковых блокад при местной холодовой травме методом лазерной доплеровской флоуметрии / Е.Н. Бурдинский, К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко [и др.] // **Забайкальский медицинский вестник.** – 2007. - №1. – С. 23-24.

32. **Михайличенко, М.И.** Особенности течения раневого процесса при глубоких отморожениях конечностей / К.Г. Шаповалов, В.А. Сизоненко, М.И. Михайличенко [и др.] // **Acta biomedica Scientifica.** - 2007. - №5. – С. 184-183. [Scopus].

33. **Михайличенко, М.И.** Изменения адгезивной функции лимфоцитов к тромбоцитам при местной холодовой травме / К.Г. Шаповалов, В.А. Сизоненко, М.И. Михайличенко [и др.] // **Acta biomedica Scientifica.** – 2007. - №5. – С. 182-183. [Scopus].

34. **Михайличенко, М.И.** Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с холодовой травмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, Ю.А. Витковский // **Забайкальский медицинский вестник.** – 2006. - №2. - С. 19-21.
35. **Михайличенко, М.И.** Изменения агрегации тромбоцитов у больных с криотравмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, С.И. Михайличенко // **Хирургическая практика.** – 2011. - №3. – С. 21-23.
36. **Михайличенко М.И.** Состояние микроциркуляторного русла и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у больных с местной холодовой травмой при различных схемах интенсивной терапии / К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко // Сб. мат. XI съезда федерации анестезиологов – реаниматологов. – С.-Пб. - 2008. - С. - 224 – 225.
37. **Михайличенко М.И.** Коллагенсвязывающая активность фактора Виллебранда и агрегация тромбоцитов у пострадавших с отморожениями / К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко, Ю.А. Витковский // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 55-летию Читинской государственной медицинской академии – Чита : ЧГМА, 2008. С. – 332 – 333.
38. **Михайличенко, М.И.** Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у пациентов с местной холодовой травмой / К.Г. Шаповалов, М.И. Михайличенко, Ю.А. Витковский // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 55-летию Читинской государственной медицинской академии – Чита : ЧГМА, 2008. – С. – 331 – 332.
39. **Михайличенко, М.И.** 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. Под общей редакцией К.Г. Шаповалова – Чита: ЧГМА, 2019. — С. – 23 — 025.
40. **Михайличенко, М.И.** Динамика электронейромиографических потенциалов у пациентов с отморожениями / М.И. Михайличенко // Современные проблемы



анестезиологии и реаниматологии. Сборник научных трудов Всероссийской конференции. Под общей редакцией К.Г. Шаповалова. – Чита: ЧГМА, 2019. — С. — 51 — 53.

41. **Михайличенко, М.И.** Электронейромиографические потенциалы у пациентов с криотравмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов // Неотложная хирургия в онкологии. Сборник тезисов научно-практической межрегиональной конференции. — Чита: ЧГМА, 2019. — С. — 54 — 55.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, А. С. Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита : дисс. ... д-ра медицинских наук : 14.01.22 / А.С. Авдеева. – Москва, 2020. – 311 с.
2. 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.
3. Вахнин, М. В. Реовазография как прогностический метод при отморожениях конечностей в дореактивный период / М. В. Вахнин, А. К. Данилов, В. Н. Гузь // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 56 (4). – С. 19–22.
4. Гайнутдинов, Э. Р. Роль асимметричного диметиларгинина у больных ишемической болезнью сердца : дисс. ... к-та мед. наук : 14.01.05 / Э.Р. Гайнутдинов. – Казань, 2010. – 116 с.
5. Гестоз: некоторые генетические механизмы его развития. / Л. Н. Сивицкая, Н. Г. Даниленко, Е. И. Барановская, О. Г. Давыденко // Медицинская генетика. – 2014. – № 13 (14). – С. 3–9.
6. Гостищев, В. К. Кожно-пластические операции у больных с отморожениями конечностей / Русский медицинский журнал. – 2009. – № 17 (25). – С. 1639–1641.
7. 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-lechenie-otmorozenij-2017.pdf> (дата обращения: 09.10.2018).
8. 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.

9. Динамика матриксных металлопротеиназ при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] - DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.13 // Acta biomedica scientifica. – 2019. - №5. – С. 79-83.

10. 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 // Гений ортопедии. – 2017. – № 23 (4). – С. 460–466.

11. 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 // Гений ортопедии. – 2017. – № 23 (4). – С. 460–466. – URL: <http://ilizarov-journal.com/index.php/go/article/view/3117> (дата обращения: 18.05.2019).

12. 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. – № 22 (31). – С. 2204–2206.

13. Изменение уровня молекул межклеточной адгезии и асимметричного диметиларгинина при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] - DOI: 10.25555/THR.2021.2.0976. // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2021. - №2. – С. 70-79.

14. 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.

15. Коннов, В.А. Закономерности изменений иммунитета и гемостаза у больных с местной холодовой травмой при различном нутритивном статусе : дисс. ... к-та мед. наук : 14.03.03 / В.А. Коннов. – Иркутск, 2015. – 119 с.

16. 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.

17. 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.

18. Лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарные взаимоотношения в различных бассейнах сосудистого русла у больных хронической формой ИБС / Б. И. Кузник, Ю. А. Витковский, А. В. Солпов [и др.] // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2012. – № 2. – С. 92–100. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/> (дата обращения: 01.03.2019).

19. 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.

20. Малолина, Е. А. Создание модели сокультивирования сертоли-подобных клеток мышцы 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: 25.09.2019).

21. 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.

22. Михайличенко, М.И. Классификация осложнений местной холодовой травмы / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров. - DOI: 10.24884/0042-4625-2021-180-2-37-41 // Вестник хирургии имени И. И. Грекова. – 2021. - №2. – С. 37–41.

23. Михайличенко, М.И. Динамика уровня миелопероксидазы и сывороточного кальпротектина при местной холодовой травме / М.И.

Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров. - DOI: 10.29413/ABS.2020-5.3.3. // Acta biomedica scientifica. – 2020. - №3. – С. 24-28.

24. Михайличенко, М.И. Влияние кальпротектина на активность межклеточных взаимодействий при местной холодовой травме / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров // Сибирское медицинское обозрение. – 2020. - №2. – С. 74-79. DOI: 10.20333/2500136-2020-2-74-79.

25. 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-oslozhneniya-posleoperatsionnogo-perioda-v-kardiohirurgii> (дата обращения: 06.03.2018).

26. Особенности нарушений микроциркуляции и межклеточных взаимодействий при местной холодовой травме / М. И. Михайличенко, К. Г. Шаповалов, В. А. Мудров [и др.]. – DOI 10.24884/1682-6655-2020-19-2-11-17 // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2020. – № 19 (2). – С. 11–17.

27. Оценка фармакологической эффективности применения серотонина адипината, опиоидного пептида DSLET и их комбинации при экспериментальном контактном отморожении на фоне активной хирургической тактики / А. Л. Чигунадзе, Е. Б. Артющкова, В. Н. Мишустин [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. – № 2. – URL: <https://cyberleninka> (дата обращения: 03.02.2019).

28. Оценка эффективности проводниковых блокад при местной холодовой травме методом лазерной доплеровской флоуметрии / К. Г. Шаповалов, В. А. Сизоненко, М. И. Михайличенко, Е. А. Томина // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2007. – № 1. – С. 23–24. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/> (дата обращения: 16.04.2018).

29. Патент № 2345713 Российская Федерация, МПК А61В8/06. Способ прогнозирования течения раневого процесса при местной холодовой травме: №

2007121162/14 : заявл. 05.06.2007 : опубл. 10.02.2009 : бюл. № 4 / Шаповалов К. Г., Сизоненко В. А., Томина Е. А., Михайличенко М. И.

30. Патент № 2554821 Российская Федерация, МПК G01N33/48. Способ оценки степени локальной холодовой травмы в раннем реактивном периоде : № 2014106093/15 : заявл. 18.02.2014 : опубл. 27.06.2015 : бюл. № 18 / Третьякова Н. Г., Винник Ю. С., Юрьева М. Ю. [и др.].

31. Патент № 2353288 Российская Федерация, МПК A61B5/01. Способ раннего прогнозирования формирования глубоких некрозов при тяжелых отморожениях верхней конечности : № 2007145696/14 : заявл. 10.12.2007 : опубл. 27.04.2009 : бюллетень № 12 / Дудариков С. А., Малаев А. А., Емец А. Н., Воронин Н. И.

32. Патент 2704785 Российская федерация, C1 A 61B 5/04. Способ прогнозирования уровня повреждения тканей при местной холодовой травме III-IV степени дистальных сегментов нижних конечностей : № 2019108730 : заявл. 26.03.2019 : опубл. 30.10.2019 : бюллетень № 31 / Михайличенко М. И., Шаповалов К. Г., Мудров В.А.

33. Патент 2712572 Российская Федерация, C1 A 61B 5/04. Способ прогнозирования развития осложнений в послеоперационном периоде при местной холодовой травме нижних конечностей : № 2019102995; заявл. 04.02.2019 : опубл. 29.01.2020 : Бюллетень № 4. / Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А.

34. Патент 2354974 Российская Федерация, МКП G01N33/53 (2006.01). Способ прогнозирования тяжести интоксикации у больных с местной холодовой травмой : № 2008101150; заявл. 09.01.2008 : опубл. 10.05.2009 : Бюллетень № 13. / Шаповалов К.Г., Витковский Ю.А., Солпов А.В., Иванов В.А.

35. Патогенетическое значение дисфункции эндотелия в формировании гипертонуса периферической сосудистой стенки при местной холодовой травме / М. И. Михайличенко, К. Г. Шаповалов, В. А. Мудров [и др.]. – DOI 10.25557/0031-2991.2020.04.54-61 // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – № 64 (4). – С. 54–61.

36. 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.).

37. Периферическая нейродеструкция у пациентов с местной холодовой травмой / М.И. Михайличенко, К.Г. Шаповалов, В.А. Мудров [и др.] - DOI: 10.18484/2305-0047.2020.4.536. // Новости хирургии. – 2020. - №4. – С. 536-542.

38. Рахимджанова, М. Т. Изучение некоторых аспектов ведения больных сахарным диабетом 1-го типа с беременностью / М. Т. Рахимджанова, С. И. Исмаилов, А. Б. Ташманова // Международный эндокринологический журнал. – 2014. – № 1 (57). – С. 62–64.

39. Ремнев, А. Г. Электронейромиография: анализируемые параметры / А. Г. Ремнев, А. А. Олейников // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 10-2. – С. 281–282.

40. 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.

41. Руюткина, Л. А. Панкреатогенный сахарный диабет/сахарный диабет типа 3с: современное состояние проблемы / Л. А. Руюткина, Д. С. Руюткин // Медицинский совет. – 2018. – № 4. – С. 28–35.

42. Сизоненко, В. А. Классификация и диагностика отморожений / В. А. Сизоненко, А. В. Михайличенко, К. Г. Шаповалов // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2008. – № 3. – С. 134.

43. Сизоненко, В. А. Холодовая травма // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 4. – С. 98–101.

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

45. 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. – ISBN 978-5-9986-0362-4.

46. Термоизоляция пораженных тканей как профилактика некрозов при холодовых поражениях в вооруженных конфликтах / М. Г. Карайланов, А. М. Шелепов, В. О. Сидельников, В. А. Бауэр // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. – № 1. – С. 70–73.

47. Томина, Е. А. Содержание нитритов в сыворотке крови у больных с местной холодовой травмой / Е. А. Томина, К. Г. Шаповалов, Ю. А. Витковский // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 3. – С. 160–161.

48. Томина, Е.А. Роль эндотелиальной дисфункции, цитокинов и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в патогенезе местной холодовой травмы: дисс. ... к-та мед. наук: 14.00.16 / Е.А. Томина. – Чита, 2008. - 118 с.

49. Троицкая, Н.И. Патофизиологические механизмы изменения микроциркуляции при различных формах острого панкреатита: дисс. ... к-та мед. наук : 14.03.03 / Н.И. Троицкая. – Чита, 2013. – 119 с.

50. Туманский, В. А. Иммуногистохимическое исследование ММП-2, ТИМП-1 при гиперпластических полипах и аденокарциноме желудка кишечного типа / В. А. Туманский, Т. А. Христенко // Морфология. – 2017. – № 11(3). – С. 21–28.

51. Холодовая травма / А. В. Хапкина, Ю. В. Карасева, С. С. Киреев [и др.]. – DOI 10.12737/25081 // Вестник новых медицинских технологий. – 2017. – № 1. – С. 153–159.

52. Цхай, В. Ф. Комплексный метод лечения отморожений // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2013. – № 2. – С. 60–64.

53. Чигунадзе, А. Л. Экспериментальное обоснование нового способа фармакологической коррекции контактного отморожения с использованием опиоидного пептида DSLET и серотонина адипината с целью оптимизации хирургического лечения: дис. ... к-та мед. наук: 14.03.06 / А.Л. Чигунадзе. – Курск, 2016. – 199 с.



54. Шапкин, Ю. Г. Эндотелиальная дисфункция в отдалённом периоде холодовой травмы / Ю.Г. Шапкин, П.К. Гамзатова, Н.Ю. Стекольников // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2014. – № 4. – С. 359–63.

55. Шаповалов, К.Г. Патогенетические механизмы местной холодовой травмы: дисс. ... д-ра мед. наук: 14.00.16 / К.Г. Шаповалов. – Чита, 2008. – 314 с.

56. Шаповалов, К. Г. Изменения сосудистого тонуса и показателей микроциркуляции при отморожении нижних конечностей / К. Г. Шаповалов, В. А. Сизоненко, Е. Н. Бурдинский // Вестник хирургии имени Грекова. – 2008. – № 3. – С. 67–68.

57. Шаповалов, К. Г. Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с холодовой травмой / К. Г. Шаповалов, М. И. Михайличенко, Ю. А. Витковский // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2006. – № 3. – С. 27–29. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/> (дата обращения: 28.06.2018).

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

59. Шаповалов, К. Г. Содержание IL-18 в крови и жидкости пузырей у больных с местной холодовой травмой / К. Г. Шаповалов, В. А. Иванов, Ю. А. Витковский // Дальневосточный медицинский журнал. – 2008. – № 2. – С. 41–42.

60. Шуткин, А.В. Повышение эффективности технологий хирургической некрэктомии при отморожениях (клинико-патогенетическое обоснование) : дисс. ... к-та мед. наук : 14.01.17 / А.В. Шуткин. – Волгоград, 2014. – 155 с.

61. Эндотелиальная секреция вазоактивных молекул при холодовой травме конечностей / К. Г. Шаповалов, В. А. Сизоненко, Е. А. Томина, Ю. А. Витковский // Травматология и ортопедия России. – 2008. – № 2. – С. 53–56.

62. Яхьяева, Т. А. Диагностика и лечение комплексного регионарного болевого синдрома // Вселенная мозга. – 2020. – № 2 (1). – С. 42–44.

63. A New Proposal for Management of Severe Frostbite in the Austere Environment / E. Cauchy, C. B. Davis, M. Pasquier [et al.]. – DOI

10.1016/j.wem.2015.11.014 // *Wilderness Environ Med.* – 2016. – Vol. 27 (1). – P. 92–99.

64. A new proposal for management of severe frostbite in the austere environment / E. Cauchy, C. B. Davis, M. Pasquier [et al.] // *Wilderness Environ Med.* – 2016. – Vol. 27 (1). – P. 92–99.

65. A new treatment for frostbite sequelae; Botulinum toxin / A. J. Norheim, J. Mercer, F. Musial, L. de Weerd. – DOI 10.1080/22423982.2016.1273677 // *Int J Circumpolar Health.* – 2017. – Vol. 76 (1). – P. 1273677.

66. A novel approach to rapid rewarming of a frostbitten extremity: The sous vide method / A. N. Fiutko, C. O. Foreman, M. Mycyk, J. Weber. – DOI 10.1016/j.ajem.2019.05.009 // *Am J Emerg Med.* – 2020. – Vol. 38 (3). – P. 463–465.

67. A novel mouse model for frostbite injury / L. J. Auerbach, M. G. Galvez, B. K. De Clerck [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2012.11.020 // *Wilderness Environ Med.* – 2013. – Vol. 24 (2). – P. 94–104.

68. Adhesion between medullary thymic epithelial cells and thymocytes is regulated by miR-181b-5p and miR-30b / L. Cotrim-Sousa, A. Freire-Assis, N. Pezzi [et al.]. – DOI 10.1016/j.molimm.2019.09.010 // *Molecular Immunology.* – 2019. – Vol. 17 (114). – P. 600–611.

69. Aicardi-Goutières syndrome: unusual neuro-radiological manifestations / G. M. H. Abdel-Salam, M. S. Abdel-Hamid, S. A. Mohammad [et al.]. – DOI 10.1007/s11011-017-9993-4 // *Metab Brain Dis.* – 2017. – Vol. 32 (3). – P. 679–683.

70. American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand: prevention of cold injuries during exercise / J. W. Castellani, A. J. Young, M. B. Ducharme [et al.]. – DOI 10.1249/01.mss.0000241641.75101.64 // *Med Sci Sports Exerc.* – 2006. – Vol. 38 (11). – P. 2012–2029.

71. Ammonia-risk distribution by logistic subsystems and type of consequence / S. Sinisa, Z. Nikola, T. Ilija [et al.]. – DOI 10.1016/j.burns.2019.07.032 // *Burns.* – 2020. – Vol. 46 (2). – P. 360–369.

72. Amputation Risk Factors in Severely Frostbitten Patients / A. Carceller, C. Javierre, M. Ríos, G. Viscor. – DOI 10.3390/ijerph16081351 // *Int J Environ Res Public Health*. – 2019. – Vol. 16 (8). – P. 1351.
73. An unusual etiology in cold injury: Liquefied petroleum gas / E. Kapı, M. Bozkurt, G. Taylan Filinte [et al.]. – DOI 10.5505/tjtes.2016.66378 // *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* – 2017. – Vol. 23 (3). – P. 258–262.
74. Anitua, E. Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair / Anitya E., Padilla S. // *Regen Med.* – 2018. – Vol. 13(1). – P. 55-72.
75. Asymmetric dimethylarginine causes arteriosclerotic lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: Involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress / O. Suda, M. Tsutsui, T. Morishita [et al.] // *Vascular Biology*. – 2014. – Vol. 24. – P. 1682–1688.
76. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase / V. Achan, M. Broadhead, M. Malaki [et al.] // *Vascular Biology*. – 2003. – Vol. 23. – P. 1455–1459.
77. Banzon, T. M. Frostbite and chilblains in Upton Sinclair's *The Jungle* / T. M. Banzon, S. A. Norton. – DOI 10.1001 /jamadermatol. 2014. 2343 // *JAMA Dermatol.* – 2015. – Vol. 151 (4). – P. 421.
78. Barriers to frostbite treatment at an academic medical center / S. L. Khan, R. Parikh, T. Mooncai [et al.]. – DOI 10.1016/j.ajem.2019.05.012 // *Am J Emerg Med.* – 2019. – Vol. 37 (8). – P. 1601.e3-1601.e5.
79. Bednarz, B. Aerosol-related thermal injuries: A simple approach to managing a frosty problem / B. Bednarz, I. King, B. S. Dheansa. – DOI 10.1016/j.bjps.2018.11.019 // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2019. – Vol. 72 (3). – P. 513–527.
80. Behandeling van bevriezingsletsels [Treating frostbite injuries] / R. R. Berendsen, N. E. Kolfschoten, V. M. de Jong [et al.] // *Ned Tijdschr Geneesk.* – 2012. – Vol. 156 (25). – A4702.

81. Bhokta, N. R. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again / N. R. Bhokta, P. G. Woodruff // *Immunol Rev.* – 2011. – Vol. 242. – P. 220–232.
82. Blann, A. D. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease and its riskfactors - what can soluble levels tell us? / A. D. Blann, G. Y. Lip. – DOI 10.1210/jcem.85.5.6594 // *Clinical Endocrinology.* – 2000. – Vol. 85 (5). – P. 1745–1750.
83. Boes, E. E. Winter eruption on the thighs / E. E. Boes, H. W. Walling, B. L. Swick. – DOI 10.1111/ced.12737 // *Clin Exp Dermatol.* – 2016. – Vol. 41 (2). – P. 224–226.
84. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response // *Natural Immunology.* – 2001. – Vol. 2. – P. 907–916.
85. Bruen, K. J. Reduction of the incidence of amputation in frostbite injury with thrombolytic therapy / K. J. Bruen, J. R. Ballard, S. E. Morris. – DOI 10.1001/archsurg.142.6.546 // *Arch. Surg.* – 2007. – Vol. 142 (6). – P. 546–551.
86. Brunet, M. Cytokines as predictive biomarkers of alloreactivity // *Clin Chim Acta.* – 2012. – Vol. 413. – P. 1354–1358.
87. Burns and frostbite in the Red Army during World War II / V. Sokolov, A. Biryukov, I. Chmyrev [et al.]. – DOI 10.1186/s40779-017-0114-9 // *Mil Med Res.* – 2017. – Vol. 4. – P. 5.
88. Burska, A. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis / A. Burska, M. Boissinot, F. Ponchel // *Mediators Inflamm.* – 2014. – P. 545–549.
89. Cabral-Pacheco GA. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases / GA Cabral-Pacheco, I Garza-Veloz, C Castruita-De la Rosa, JM Ramirez-Acuña, BA Perez-Romero, JF Guerrero-Rodriguez, N Martinez-Avila, ML Martinez-Fierro // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21(24). P. 9739. DOI 10.3390/ijms21249739.
90. Calprotectin in rheumatic diseases / F. Ometto, L. Friso, D. Astorri [et al.] // *Exper Biol Med.* – 2017. – Vol. 242. – P. 859–863.

91. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 41-2009. A 16-year-old boy with hypothermia and frostbite / R. L. Sheridan, M. A. Goldstein, F. J. Jr Stoddard, T. G. Walker // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 361 (27). – P. 2654–2662.
92. Case report of frostbite with delay in evacuation: field use of iloprost might have improved the outcome / S. Irarrazaval, P. Besa, E. Cauchy [et al.] // *High Alt Med Biol.* – 2018. – Vol. 19 (4). – P. 382–387.
93. Catalfamo, M. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection / M. Catalfamo, S. C. Le, H. C. Lane // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2012. – Vol. 23. – P. 207–214.
94. Catheter-directed intraarterial thrombolysis as part of a multidisciplinary management protocol of frostbite injury / S. Tavri, S. Ganguli, R. G. Jr Bryan [et al.] // *J Vasc Interv Radiol.* – 2016. – Vol. 27 (8). – P. 1228–1235.
95. Cauchy, E. A controlled trial of a prostacyclin and rt-PA in the treatment of severe frostbite / E. Cauchy, B. Cheguillaume, E. Chetaille // *N Engl J Med.* – 2011. – Vol. 364 (2). – P. 189–190.
96. Chilblain lupus erythematosus treated successfully with mycophenolate mofetil / L. Gouillon, S. Debarbieux, M. Berruyer [et al.]. – DOI 10.1111/ijd.13614 // *Int J Dermatol.* – 2017. – Vol. 56 (8). – e158–e159.
97. Chilblains / A. Nyssen, F. Benhadou, M. Magnee [et al.]. – DOI 10.1024/0301-1526/a000838 // *Vasa.* – 2020. – Vol. 49 (2). – P. 133–140.
98. Choong, W. L. Frostbite following cryolipolysis treatment in a beauty salon: a case study / W. L. Choong, H. S. Wohlgemut, M. J. Hallam. – DOI 10.12968/jowc.2017.26.4.188 // *J Wound Care.* – 2017. – Vol. 26 (4). – P. 188–190.
99. Chronic chilblains: the clinical presentation and disease course in a large paediatric series / S. Padeh, M. Gerstein, S. Greenberger, Y. Berkun // *Clin Exp Rheumatol.* – 2013. – Vol. 31 (3). – P. 463–468.
100. Chronic non-freezing cold injury results in neuropathic pain due to a sensory neuropathy / T. A. Vale, M. Symmonds, M. Polydefkis [et al.]. – DOI 10.1093/brain/awx215 // *Brain.* – 2017. – Vol. 140 (10). – P. 2557–2569.

101. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease / S. Blankenberg, H. J. Rupprecht, C. Bickel [et al.]. – DOI 10.1161/hc3701.95949 // *Circulation*. – 2001. – Vol. (104). – P. 1336–1341.
102. Clough, G. F. High Molecular Weight Targets and Treatments Using Microdialysis. *Microdialysis in Drug Development* / G. F. Clough, J. A. Stenken, M. K. Church. – New York : Springer, 2013. – P. 243–268.
103. Coagulative modifications in patients with systemic sclerosis treated with iloprost or nifedipine / M. Candela, A. Pansoni, L. Jannino [et al.] // *Ann Ital Med Int*. – 2001. – Vol. 16 (3). – P. 170–174.
104. Cold exposure injuries to the extremities / A. Golant, R. M. Nord, N. Paksima, M. A. Posner. – DOI 10.5435/00124635-200812000-00003 // *J Am Acad Orthop Surg*. – 2008. – Vol. 16 (12). – P. 704–715.
105. Cold sensitivity and associated factors: a nested case-control study performed in Northern Sweden / A. Stjernbrandt, D. Carlsson, H. Pettersson [et al.]. – DOI 10.1007/s00420-018-1327-2 // *Int Arch Occup Environ Health*. – 2018. – Vol. 91 (7). – P. 785–797.
106. Cold Susceptibility of Digit Stumps Resulting from Amputation After Freezing Cold Injury in Elite Alpinists / J. Gorjanc, S. A. Morrison, R. Blagus, I. B. Mekjavic. – DOI 10.1089/ham.2017.0134 // *High Alt Med Biol*. – 2018. – Vol. 19 (2). – P. 185–192.
107. Cold thermal injury from cold caps used for the prevention of chemotherapy-induced alopecia / V. R. Belum, G. de Barros Silva, M. T. Laloni [et al.]. – DOI 10.1007/s10549-016-3799-7 // *Breast Cancer Res Treat*. – 2016. – Vol. 157 (2). – P. 395–400.
108. Cold-Induced Injury Affecting 27% of TBSA: A Case Report / J. M. Piqueras Pérez, P. Blanco Schweizer, B. Bendito Guilarte [et al.]. – DOI 10.1093/jbcr/irz107 // *J Burn Care Res*. – 2019. – Vol. 40 (6). – P. 1012–1014.
109. Computational and Experimental Analysis of the Transmembrane Domain 4/5 Dimerization Interface of the Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> Receptor / Gorinski N.,

Kowalsman N., Renner U. [et al.] // *Molecular Pharmacology*. — 2012. — Vol. 82(3). — P. 448—463. — DOI:10.1124/mol.112.079137. — PMID 22669805.

110. Cooke, J. P. Asymmetrical dimethylarginine: The Uber marker / J. P. Cooke // *Circulation*. — 2004. — Vol. 17. — P. 170–177.

111. Craig, R. P. Military cold injury during the war in the Falkland Islands 1982: an evaluation of possible risk factors / R. P. Craig. — DOI 10.1136/jramc-153-03s-24 // *J R Army Med Corps*. — 2007. — Vol. 153, suppl 1. — P. 63–68.

112. Cubitt, J. J. Response to: "'Salt ice dare": a previously undescribed mechanism of rapid frostbite injury' / J. J. Cubitt, W. A. Dickson. — DOI 10.1016/j.bjps.2014.07.042 // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. — 2014. — Vol. 67 (11). — P. e295.

113. Cutter, L. Extreme Weather Conditions: Military Medicine Responds to a Korean War Winter / L. Cutter. — DOI 10.7205/MILMED-D-15-00067 // *Mil Med*. — 2015. — Vol. 180 (9). — P. 1017–1018.

114. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy / I. Striz, E. Brabcova, L. Kolesar, A. Sekerkova // *Clin Sci*. — 2014. — Vol. 126. — P. 593–612.

115. Cytokines and Alzheimer's disease / L. Velluto, C. Iarlori, D. Gambi, M. Reale. — DOI 10.1201/b11037-28 // *Science Publishers*. — 2011. — P. 329–342.

116. Daanen, H. A. Resistance Index of Frostbite as a predictor of cold injury in arctic operations / H. A. Daanen, N. R. van der Struijs // *Aviat Space Environ Med*. — 2005. — Vol. 76 (12). — P. 1119–1122.

117. Dabigatran - Metabolism, Pharmacologic Properties and Drug Interactions / N. M. Antonijevic, I. D. Zivkovic, L. M. Jovanovic [et al.]. — DOI 10.2174/1389200218666170427113504 // *Curr Drug Metab*. — 2017. — Vol. 18 (7). — P. 622–635.

118. De Buck, E. BET 1: Does the use of emollients prevent frostbite to the face? / E. De Buck. — DOI 10.1136/emered-2017-207232.1 // *Emerg Med J*. — 2017. — Vol. 34 (11). — P. 763–764.

119. Deep Frostbite Treated With Hyperbaric Oxygen and Thrombolytic Therapies / B. Higdon, L. Youngman, M. Regehr, A. Chiou // *Wounds*. – 2015. – Vol. 27 (8). – P. 215–223.
120. Deep frostbite: Clinical characteristics and outcomes in northeastern China / J. C. Zhao, X. Fan, J.A. Yu [et al.]. – DOI 10.1016/j.jtv.2020.01.006 // *J Tissue Viability*. – 2020. – Vol. 29 (2). – C. 110–115.
121. Deep Frostbite: the Question of Adjuvant Treatment / J. Haik, S. Brown, A. Liran [et al.] // *Isr Med Assoc J*. – 2016. – Vol. 18 (1). – P. 56–57.
122. Delayed treatment of frostbite with hyperbaric oxygen: a report of two cases / C. A. Lansdorp, G. R. Roukema, O. Boonstra, J. Dokter // *Undersea Hyperb Med*. – 2017. – Vol. 44 (4). – P. 365–369.
123. Dempsey, A. I. Endurance-Frostbite, Then and Now / A. I. Dempsey, K. Walley, J. S. Kirby. – DOI 10.1001/jamadermatol.2018.0734 // *JAMA Dermatol*. – 2018. – Vol. 154 (6). – P. 707.
124. Desai, N. R. Reversal agents for direct oral anticoagulants: considerations for hospital physicians and intensivists / N. R. Desai, D. Cornutt. – DOI 10.1080/21548331.2019.1643728 // *Hosp Pract (1995)*. – 2019. – Vol. 47 (3). – P. 113–122.
125. Diabetes-induced early molecular and functional changes in aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis / M. M. Tucureanu, A. Filippi, N. Alexandru [et al.]. – DOI 10.1177/1479164119874469 // *Diabetic Vascular Disease*. – 2019. – Vol. 16 (6). – P. 562–576.
126. Diagnosis, characterisation and evaluation of treatment response of frostbite using pertechnetate scintigraphy: a prospective study / A. Bhatnagar, B. B. Sarker, K. Sawroop [et al.] // *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. – 2002. – Vol. 29 (2). – P. 170–175.
127. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium / S. Moncada, A. G. Herman, E. A. Higgs, J. R. Vane // *Thrombosis Res*. – 1977. – Vol. 11. – P. 323–344.



128. Dipak, P. R. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets / P. R. Dipak, T. Davies. – DOI 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003 // *Cytokines*. – 2015. – Vol. 26 (6). – P. 673–685.
129. Direct oral anticoagulants: An update / A. I. Franco Moreno, R. M. Martín Díaz, M. J. García Navarro. – DOI 10.1016/j.medcli.2017.11.042 // *Med Clin (Barc)*. – 2018. – Vol. 151 (5). – P. 198–206.
130. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery / T. Gui, A. Shimokado, Y. Sun [et al.] // *Mediators Inflammation*. – 2012. – Vol. 693083. – P. 14.
131. Diversity Study Investigators. Safety of dabigatran etexilate for the secondary prevention of venous thromboembolism in children / L. R. Brandão, M. Albisetti, J. Halton [et al.]. – DOI 10.1182/blood.2019000998 // *Blood*. – 2020. – Vol. 135 (7). – P. 491–504.
132. Dobnikar, U. The effect of exercise-induced elevation in core temperature on cold-induced vasodilatation response in toes / U. Dobnikar, S. N. Kounalakis, I. B. Mekjavic // *Eur J Appl Physiol*. – 2009. – Vol. 106 (3). – P. 457–464.
133. Downregulations of TRPM8 expression and membrane trafficking in dorsal root ganglion mediate the attenuation of cold hyperalgesia in CCI rats induced by GFR $\alpha$ 3 knockdown / L. Su, R. Shu, C. Song [et al.]. – DOI 10.1016/j.brainresbull.2017.08.002 // *Brain Res Bull*. – 2017. – Vol. 135. – P. 8–24.
134. Drinane, J. Comments on "The Use of tPA in the Treatment of Frostbite: A Systematic Review" / J. Drinane, V. S. Kotamarti, J. A. Ricci. – DOI 10.1177/1558944719850629 // *Hand (N Y)*. – 2019. – Vol. 14 (4). – P. 575–577.
135. Drug interaction: dabigatran (Pradaxa) and statins // *Med Lett Drugs Ther*. – 2017. – Vol. 59 (1513). – P. 26.
136. Durrer, B. Management von lokalen Kälteschäden in und außerhalb der Praxis [Management of frostbite in and outside of the doctor's surgery] / B. Durrer. – DOI 10.1024/0040-5930/a000640 // *Ther Umsch*. – 2015. – Vol. 72 (1). – P. 55–57.
137. Early Mobilization in Lower Extremity Frostbite Injury: Preliminary Experience at a Single Burn Center / M. Dole, F. W. Endorf, J. Gayken [et al.]. – DOI

10.1097/BCR.0000000000000590 // J Burn Care Res. –2010. - Vol. 39 (3). – P. 339–344.

138. Early mobilization in lower extremity frostbite injury: preliminary experience at a single burn center / M. Dole, F. W. Endorf, J. Gayken [et al.] // J Burn Care Res. – 2018. – Vol. 39 (3). – P. 339–344.

139. Effect of shear-induced platelet activation on red blood cell aggregation / H. Lee, K. Lee, B. K. Lee [et al.]. – DOI 10.3233/CH-16191 // Clin Hemorheol Microcirc. – 2017. – Vol. 66 (2). – P. 97–104.

140. Effects of haemodilution and rewarming with regard to digital amputation in frostbite injury: an experimental study in the rabbit / G. Martinez Villen, G. Garcia Bescos, V. Rodriguez Sosa, J. R. Morandeira Garcia. – DOI 10.1054/jhsb.2001.0743 // J Hand Surg Br. – 2002. – Vol. 27 (3). – P. 224–228.

141. Efficacy of cervicothoracic sympathectomy versus conservative management in patients suffering from incapacitating Raynaud's syndrome after frostbite / M. I. Khan, M. Tariq, A. Rehman [et al.] // J Ayub Med Coll Abbottabad. – 2008. – Vol. 20 (2). – P. 21–24.

142. Efficacy of intravenous tissue plasminogen activator in frostbite patients and presentation of a treatment protocol for frostbite patients / A. R. Johnson, H. L. Jensen, G. Peltier, E. Delacruz // Foot Ankle Spec. – 2011. – Vol. 4 (6). – P. 344–348.

143. Eglin, C. M. Non-freezing cold injury: a multi-faceted syndrome / C. M. Eglin, H. Montgomery, M. J. Tipton. – DOI 10.1093/brain/awx321 // Brain. – 2018. – Vol. 141 (2). – P. e9.

144. Ekdahl, M. Successful conservative treatment of severe frostbite lesions in a Greenlandic Inuit / M. Ekdahl, L. Penninga. – DOI 10.1136/bcr-2017-219672 // BMJ Case Rep. – 2017. – Vol. 19. – bcr2017219672.

145. Endothelial dysfunction – the early predictor of atherosclerosis / M. Mudau, A. Genis, A. Lochner, H. Strijdom // Cardiovasc Journal. – 2012. – Vol. 23 (4). – P. 222–231.

146. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia / M. D.

Savvidou, A. D. Hingorani, D. Tsikas [et al.] // *Lancet*. 2003. – Vol. 361. – P. 1511–1517.

147. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical / L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood // *Circulation Resources*. – 1987. – Vol. 61. – P. 866–879.

148. Endurance-Frostbite, Then and Now / A. I. Dempsey, K. Walley, J. S. Kirby. – DOI 10.1001/jamadermatol.2018.0734 // *JAMA Dermatol*. – 2018. – Vol. 154 (6). – P. 707.

149. Epicatechins promote vascular health through epigenetic reprogramming of endothelial-immune cell signaling and reversing systemic low-grade inflammation / D. Milenkovic, K. Declerck, Y. Guttman [et al.]. – DOI 10.1016/j.bcp.2019.113699 // *Biochemistry Pharmacology*. – 2019. – Vol. (19). – P. 113–119.

150. Evaluating cold, wind, and moisture protection of different coverings for prehospital maritime transportation-a thermal manikin and human study / K. Jussila, S. Rissanen, K. Parkkola, A. Hannu. – DOI 10.1017/S1049023X14001125 // *Prehosp Disaster Med*. – 2014. – Vol. 29 (6). – P. 580–588.

151. Expeditionary Immersion Circulating Heating Device: A Promising Technique for Treating Frostbite Injuries and Warming Intravenous Fluids in a Forward Deployed Cold Weather Environment / E. M. Vinceslio, Z. Fayos, A. Bernadette, J. M. Van Gent. – DOI 10.1093/milmed/usaa213 // *Mil Med*. – 2020. – Vol. 185 (11-12). – e2039-e2043.

152. Face cooling by cold wind in walking subjects / D. Gavhed, T. Mäkinen, I. Holmér, H. Rintamäki. – DOI 10.1007/s00484-003-0159-1 // *Int J Biometeorol*. – 2003. – Vol. 47 (3). – P. 148–155.

153. Fallahi, A. A 3D thermal model to analyze the temperature changes of digits during cold stress and predict the danger of frostbite in human fingers / A. Fallahi, M. Reza Salimpour, E. Shirani. – DOI 10.1016/j.jtherbio.2017.03.001 // *J Therm Biol*. – 2017. – Vol. 65. – P. 153–160.

154. Fallahi, A. Analytical expressions for estimating endurance time and glove thermal resistance related to human finger in cold conditions / A. Fallahi, M. R. Salimpour, E. Shirani. – DOI 10.1016/j.jtherbio.2017.09.006 // *J Therm Biol.* – 2017. – Vol. 69. – P. 334–340.
155. Ferrara, G. Cold-Associated Perniosis of the Thighs ("Equestrian-Type" Chilblain): A Reappraisal Based on a Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 6 Cases / G. Ferrara, L. Cerroni. – DOI 10.1097/DAD.0000000000000477 // *Am J Dermatopathol.* – 2016. – Vol. 38 (10). – P. 726–731.
156. FINDERLE, Z. Delayed treatment of frostbite injury with hyperbaric oxygen therapy: a case report / Z. FINDERLE, K. CANKAR // *Aviat Space Environ Med.* – 2002. – Vol. 73 (4). – P. 392–394.
157. Finger and Toe Temperature Responses to Cold After Freezing Cold Injury in Elite Alpinists / S. A. MORRISON, J. GORJANC, O. EIKEN, I. B. MEKJAVIC. – DOI 10.1016/j.wem.2014.12.026 // *Wilderness Environ Med.* – 2015. – Vol. 26 (3). – P. 295–304.
158. Finger- and toe-temperature responses to local cooling and rewarming have limited predictive value identifying susceptibility to local cold injury-a cohort study in military cadets / L. NORRBRAND, R. KÖLEGÅRD, M. E. KERAMIDAS [et al.]. – DOI 10.1016/j.apergo.2019.102964 // *Appl Ergon.* – 2020. – Vol. 82. – P. 102964.
159. Folio, L. R. Frostbite in a mountain climber treated with hyperbaric oxygen: case report / L. R. Folio, K. Arkin, W. P. Butler // *Mil Med.* – 2007. – Vol. 172 (5). – P. 560–563.
160. Freezing and non-freezing cold weather injuries: a systematic review / K. Heil, R. Thomas, G. Robertson [et al.]. – DOI 10.1093/bmb/ldw001 // *Br Med Bull.* – 2016. – Vol. 117 (1). – P. 79–93.
161. Frostbite and Immersion Foot Care / A. Hall, J. Sexton, B. Lynch [et al.]. – DOI 10.1093/milmed/usy085 // *Mil Med.* – 2018. – Vol. 183, suppl 2. – P. 168–171.
162. Frostbite Injuries in the Austrian Alps: A Retrospective 11-Year National Registry Study / M. Ströhle, S. Rauch, P. Lastei [et al.]. – DOI 10.1089/ham.2018.0060 // *High Alt Med Biol.* – 2018. – Vol. 19 (4). – P. 316–320.

163. Frostbite protection in mice expressing an antifreeze glycoprotein / M. Heisig, S. Mattessich, A. Rembisz [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0116562 // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (2). – e0116562.
164. Frostbite animal model preparation specification (draft) / M. S. Miao, L. L. Xiang, M. Bai, L. H. Cao. – DOI 10.19540/j.cnki.cjcmm.20171027.010 // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2018. – Vol. 43 (2). – P. 410–414.
165. Frostbite: a practical approach to hospital management / C. Handford, P. Buxton, K. Russell [et al.] // Extrem Physiol Med. – 2014. – Vol. 3. – P. 7–9.
166. Frostbite: incidence and predisposing factors in mountaineers / I. Harirchi, A. Arvin, J. H. Vash, V. Zafarmand. – DOI 10.1136/bjism.2004.016097 // Br J Sports Med. – 2005. – Vol. 39 (12). – P. 898–901.
167. Frostbite: pathogenesis and treatment / J. V. Murphy, P. E. Banwell, A. H. Roberts, D. A. McGrouther // J Trauma. – 2000. – Vol. 48 (1). – P. 171–178.
168. Frostbite: Spectrum of Imaging Findings and Guidelines for Management / J. D. Millet, R. K. Brown, B. Levi [et al.]. – DOI 10.1148/rg.2016160045 // Radiographics. – 2016. – Vol. 36 (7). – P. 2154–2169.
169. Fudge, J. Preventing and Managing Hypothermia and Frostbite Injury / J. Fudge. – DOI 10.1177/1941738116630542 // Sports Health. – 2016. – Vol. 8 (2). – P. 133–139.
170. Furchgott, R. F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki // Nature. – 1980. – Vol. 288. – P. 373–376.
171. Geurts, C. L. Local cold acclimation during exercise and its effect on neuromuscular function of the hand / C. L. Geurts, G. G. Sleivert, S. S. Cheung // Appl Physiol Nutr Metab. – 2006. – Vol. 31 (6). – P. 717–725.
172. Gilabert Estelle's, J. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems // Human Reproduction. – 2007. – Vol. 22 (8). – P. 2120–2127.

173. Gildenberg, P. L. The effect of immediate sympathectomy on tissue survival following experimental frostbite / P. L. Gildenberg, E. Hardenbergh // *Ann Surg.* – 1964. – Vol. 160. – P. 160–168.
174. Guo W. The inhibitory effect of quercetin on asymmetric dimethylarginine-induced apoptosis is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway in glomerular endothelial cells / W Guo, J Ding, A Zhang, W Dai, S Liu, Z Diao, L Wang, X Han, W Liu. // *Int J Mol Sci.* – 2014. - Vol. 15(1). – P. 484-503. doi: 10.3390/ijms15010484.
175. Goertz, O. Determination of Microcirculatory Changes and Angiogenesis in a Model of Frostbite Injury In Vivo / O. Goertz, S. Baerreiter, A. Ring. – DOI 10.1016/j.jss.2009.07.012 // *J. Surg. Res.* 2009. – Vol 11 (4). – P. 304–308.
176. Grading strength of recommendations and quality of evidence in clinical guidelines: report from an American College of Chest Physicians Task Force / G. Guyatt, D. Gutterman, M. H. Baumann [et al.] // *Chest.* – 2006. – Vol. 129 (1). – P. 174e81.
177. Guly, H. R. Frostbite and other cold injuries in the heroic age of Antarctic exploration / H. R. Guly. – DOI 10.1016/j.wem.2012.05.006 // *Wilderness Environ Med.* – 2012. – Vol. 23 (4). – P. 365–370.
178. Handford, C. Imray CHE. Frostbite / C. Handford, O. Thomas // *Emerg Med Clin North Am.* – 2017. – Vol. 35 (2). – P. 281–299.
179. Heaton, S. M. Bullous Dermatitis: Challenge / S. M. Heaton, B. Green, M. C. Royer. – DOI 10.1097/DAD.0000000000000290 // *Am J Dermatopathol.* – 2016. – Vol. 38 (8). – P. 614–615.
180. Heil, K. M. British Military freezing cold injuries: a 13-year review / K. M. Heil, E. H. Oakley, A. M. Wood. – DOI 10.1136/jramc-2015-000445 // *J R Army Med Corps.* – 2016. – Vol. 162 (6). – P. 413–418.
181. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> differentially regulates receptor signalling and trafficking / Renner U., Zeug A., Woehler A. [et al.] // *Journal of Cell Science.* — 2012. — Vol. 125(10). — P. 2486—2499. — doi:10.1242/jcs.101337. — PMID 22357950.

182. Higdon, B. Deep Frostbite Treated With Hyperbaric Oxygen and Thrombolytic Therapies / B. Higdon, L. Youngman, M. Regehr // *Chiou A.Wounds*. – 2015. – Vol. 27 (8). – P. 215–23.
183. Hong F.F. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment / F.F. Hong, X.Y. Liang, W. Liu, S. Lv, S.J. He, H.B. Kuang, S.L. Yang // *Inflamm Res*. – 2019. – Vol. 68(6). – P. 429-441. DOI 10.1007/s00011-019-01229-9.
184. House, C. M. Repeatability of a cold stress test to assess cold sensitization / C. M. House, R. J. Taylor, E. H. Oakley. – DOI 10.1093/occmed/kqv111 // *Occup Med (Lond)*. – 2015. – Vol. 65 (7). – P. 578–584.
185. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy / G. Schett, D. Elewaut, I. B. McInnes [et al.] // *Nat Med*. – 2013. – Vol. 19. – P. 822–824.
186. 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.
187. Hutchison, R. L. The use of tPA in the treatment of frostbite: a systematic review / R. L. Hutchison, H. M. Miller, S. K. Michalke // *Hand (NY)*. – 2019. – Vol. 14 (1). – P. 13–18.
188. Hyperbaric oxygen treatment in deep frostbite of both hands in a boy / D. Von Heimburg, E. M. Noah, U. P. Sieckmann, N. Pallua // *Burns*. – 2001. – Vol. 27 (4). – P. 404–408.
189. Hyperoxia decreases cutaneous blood flow in high-perfusion areas / A. Rousseau, I. Steinwall, R. D. Woodson, F. Sjoberg // *Microvasc Res*. – 2007. – Vol. 74 (1). – P. 15–22.
190. Iatrogenic Full-Thickness Frostbite Injury Caused by the Use of a Conductive Cooling Device / C. Muetterties, E. Weiss, S. Tomlinson-Hansen, W. Hughes. – DOI 10.1097/BCR.0000000000000623 // *J Burn Care Res*. – 2018. – Vol. 39 (5). – P. 843–845.
191. Ikäheimo, T. M. Frostbites in circumpolar areas / T. M. Ikäheimo, J. Hassi. – DOI 10.3402/gha.v4i0.8456 // *Glob Health Action*. – 2011. – Vol. 4.

192. Imray, C. Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries / C. Imray, A. Grieve, S. Dhillon // *Postgrad Med J.* – 2009. – Vol. 85 (1007). – P. 481–488.
193. Imray, C. H. Cold still kills: cold-related illnesses in military practice freezing and non-freezing cold injury / C. H. Imray, E. H. Oakley. – DOI 10.1136/jramc-151-04-02 // *J R Army Med Corps.* – 2005. – Vol. 151 (4). – P. 218–222.
194. Imray, C. H. Non-freezing cold injury / C. H. Imray. – DOI 10.1136/jramc-2018-001145 // *J R Army Med Corps.* – 2019. – Vol. 165 (6). – P. 388–389.
195. In Vivo Microdialysis Sampling of Cytokines from Rat Hippocampus: Comparison of Cannula Implantation Procedures / T. W. Vasicek, M. R. Jackson, T. M. Poseno, J. A. Stenken // *ACS Chem Neurosci.* – 2013. – Vol. 4. – P. 737–746.
196. Inflammatory Cytokines in Heart Failure: Mediators and Markers / L. Gullestad, T. Ueland, L. E. Vinge [et al.] // *Cardiology.* – 2012. – Vol. 122. – P. 23–35.
197. Infrared thermographic analysis of surface temperature of the hands during exposure to normobaric hypoxia / D. Jones, S. F. Covins, G. E. Miller [et al.] // *High Alt Med Biol.* – 2018. – Vol. 19 (4). – P. 388–393.
198. Injury-induced cold sensitization in *Drosophila* larvae involves behavioral shifts that require the TRP channel Brv1 / H. N. Turner, A. A. Patel, D. N. Cox, M. J. Galko. – DOI 10.1371/journal.pone.0209577 // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13 (12). – P. e0209577.
199. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. – URL: [www.icjme.org](http://www.icjme.org) (date of the application: 12.09.2020).
200. Intra-arterial thrombolysis for extremity frostbite decreases digital amputation rates and hospital length of stay / N. Patel, D. R. Srinivasa, R. N. Srinivasa [et al.]. – DOI 10.1007/s00270-017-1729-7 // *Cardiovasc Intervent Radiol.* – 2017. – Vol. 40 (12). – P. 1824–1831.



201. Iserson, K. V. Glove and mitten protection in extreme cold weather: an Antarctic study / K. V. Iserson. – DOI 10.3402/ijch.v75.33564 // *Int J Circumpolar Health*. – 2016. – Vol. 10, № 75. – P. 33564.
202. Item 237--UE 8 Acrosyndromes (phénomène de Raynaud, érythralgie, acrocyanose, engelures, ischémie digitale / CEDEF. – DOI 10.1016/j.annder.2015.04.001 // *Ann Dermatol Venereol*. – 2015. – Vol. 142, suppl. 2. – S195–200.
203. Jenabzadeh, K. Frostbite: a single institution's twenty year experience with intraarterial thrombolytic therapy / K. Jenabzadeh, W. Mohr, D. Ahrenholz // *J Burn Care Research*. – 2006. – Vol. 30 (2). – P. 103–110.
204. Jiang, M. Progress of succinic acid production from renewable resources: Metabolic and fermentative strategies / M. Jiang, J Ma, M Wu, R Liu, L Liang, F Xin, W Zhang, H Jia, W Dong // *Bioresour Technol*. – 2017. – Vol. 245. – P. 1710-1717. DOI 10.1016/j.biortech.2017.05.209.
205. Jones, L. Frostbite: Don't be left out in the cold. Laskowski // L. Jones, L. J. Jones. – DOI 10.1097 / 01. NURSE. 0000529802. 75665. d7 // *Nursing*. – 2018. – Vol. 48 (2). – P. 26–33.
206. Jorum, E. A 4-year follow-up of non-freezing cold injury with cold allodynia and neuropathy in 26 naval soldiers / E. Jorum, P. K. Opstad. – DOI 10.1515/sjpain-2019-0035 // *Scand J Pain*. – 2019. – Vol. 19 (3). – P. 441–451.
207. Jurkovich, G. J. Environmental cold-induced injury / G. J. Jurkovich, J. P. Weglinski // *Surg Clin North Am*. – 2007. – Vol. 87 (1). – P. 247–267.
208. Kaller, M. BET 2: treatment of frostbite with iloprost // *Emerg Med J*. – 2017. – Vol. 34 (10). – P. 689–690.
209. Karnell J.L. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond / J.L. Karnell, S.A. Rieder, R. Ettinger, R. Kolbeck // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2019. – Vol. 141. – P. 92-103. DOI 10.1016/j.addr.2018.12.005.
210. Khanday, M. A. Explicit formula of finite difference method to estimate human peripheral tissue temperatures during exposure to severe cold stress / M. A.

Khanday, F. Hussain. – DOI 10.1016/j.jtherbio.2014.12.010 // *J Therm Biol.* – 2015. – Vol. 48. – P. 51–55.

211. Kingma, C. F. Relation between finger cold-induced vasodilation and rewarming speed after cold exposure / C. F. Kingma, I. I. Hofman, H. A. M. Daanen. – DOI 10.1007/s00421-018-4012-y // *Eur J Appl Physiol.* – 2019. – Vol. 119 (1). – P. 171–180.

212. Kiss, T. L. Critical care for frostbite / T. L. Kiss. – DOI 10.1016/j.ccell.2012.07.001 // *Crit Care Nurs Clin North Am.* – 2012. – Vol. 24 (4). – P. 581–591.

213. Kite skier's toe: an unusual case of frostbite / K. W. Russell, C. H. Imray, S. E. McIntosh [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2012.11.013 // *Wilderness Environ Med.* – 2013. – Vol. 24 (2). – P. 136–140.

214. Knapik, J. J. Frostbite: Pathophysiology, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention / J. J. Knapik, K. L. Reynolds, J. W. Castellani // *J Spec Oper Med.* – 2020. – Vol. 20 (4). – P. 123–135.

215. Kolar, L. Acute bilateral hand edema and vesiculation / L. Kolar, M. Khodae // *J Fam Pract.* – 2020. – Vol. 69 (4). – E1-E3.

216. Kong, L. Study of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) on Bone Homeostasis / L. Kong, X. Yang. – DOI 10.2174/1389450120666190927122553 // *Curr Drug Targets.* – 2019. – Vol. 4. – P. 31–37.

217. Kopec-Medrek, M. Calprotectin in rheumatic diseases: a review / M. Kopec-Medrek, M. Widuchowska, E. Kucharz. – DOI 10.5114/reum.2016.64907 // *Reumatologia.* – 2016. – Vol. 54. – P. 6.

218. Kuht, J. A. Case series of non-freezing cold injury: epidemiology and risk factors / J. A. Kuht, D. Woods, S. Hollis. – DOI 10.1136/jramc-2018-000992 // *J R Army Med Corps.* – 2019. – Vol. 165 (6). – P. 400–404.

219. Küpper, T. Cold exposure during helicopter rescue operations in the Western Alps / T. Küpper, J. Steffgen, P. Jansing. – DOI 10.1093/annhyg/meg008 // *Ann Occup Hyg.* – 2003. – Vol. 47 (1). – P. 7–16.

220. L1CAM expression in colorectal cancer identifies a high-risk group of patients with dismal prognosis already in early-stage disease / A. Tampakis, E. C. Tampaki, A. Nonni [et al.]. – DOI 10.1080/0284186X.2019.1667022 // *Acta Oncology*. – 2019. – Vol. (18). – P. 1–5.
221. Landim, M. B. dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis / M. B. Landim, F. A. Casella, A. C. Chagas // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2009. – Vol. 64 (5). – P. 471–478.
222. 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.
223. Lankford, H. V. Dull Brains and Frozen Feet: A Historical Essay on Cold / H. V. Lankford. – DOI 10.1016/j.wem.2016.09.005 // *Wilderness Environ Med*. – 2016. – Vol. 27 (4). – P. 526–532.
224. Larrey, D. J. *Memoirs of Military Surgery and Campaigns of the French Armies* / D. J. Larrey. – Baltimore ; Cushing. – 1974. – Vol. 1814. – P. 156–164.
225. Laskowski-Jones, L. Frostbite: Don't be left out in the cold / L. Laskowski-Jones, L. J. Jones. – DOI 10.1097/01.NURSE.0000529802.75665.d7 // *Nursing*. – 2018. – Vol. 48 (2). – P. 26–33.
226. Läubli, H. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis / H. Läubli, L. Borsig. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02120 // *Front Immunology*. – 2019. – Vol. (6). – P. 10–13.
227. Lee, D. W. Cytokines in acute kidney injury (AKI) / D. W. Lee, S. Faubel, C. L. Edelstein // *Clin Nephrol*. – 2011. – Vol. 76. – P. 165–173.
228. Lee, J. What Interventional Radiologists Need to Know About Managing Severe Frostbite: A Meta-Analysis of Thrombolytic Therapy / J. Lee, M. C. S. S. Higgins. – DOI 10.2214/AJR.19.21592 // *AJR Am J Roentgenol*. – 2020. – Vol. 214 (4). – P. 930–937.
229. Lehmuskallio, E. Emollients in the prevention of frostbite // *Int J Circumpolar Health*. – 2000. – Vol. 59 (2). – P. 122–130.

230. Leonard, C. D. Full-thickness wounds resulting from 'do-it-yourself' cryolipolysis: a case study / C. D. Leonard, S. A. Kahn, J. B. Summitt. – DOI 10.12968/jowc.2016.25.Sup4.S30 // *J Wound Care*. – 2016. – Vol. 25 (4). – S30–2.
231. Les gelures, des lésions locales liées à un froid mordant [Frostbites: cold-freezing injuries due to a biting cold] / I. Lefebvre de Plinval, J. Josnard, M. Honnorat. – DOI 10.1016/j.revinf.2017.12.002 // *Rev Infirm*. – 2018. – Vol. 67 (238). – P. 40–43.
232. Lopez-Rivera, E. Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration / E. Lopez-Rivera. – DOI 10.1093/humrep/dem149 // *PNAS*. – 2005. – Vol. 102 (10). – P. 3685–3690.
233. Lorentzen, A. K. Frostbite-A Case Series From Arctic Greenland / A. K. Lorentzen, L. Penninga. – DOI 10.1016/j.wem.2018.03.001 // *Wilderness Environ Med*. – 2018. – Vol. 29 (3). – P. 392–400.
234. Lorentzen, A. K. Interventions for frostbite injuries / A. K. Lorentzen, C. Davis, L. Penninga. – DOI 10.1002/14651858.CD012980.pub2 // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2020. – Vol. 12. – CD012980.
235. Lotrich, F. Inflammatory cytokines, growth factors, and depression // *Curr Pharm Des*. – 2012. – Vol. 18. – P. 5920–5935.
236. Maguire, C. R. Intentional self-inflicted and peer-inflicted aerosol skin injuries called 'frosties': Cohort series and systematic literature review / C. R. Maguire, B. Patel, C. A. McBride. – DOI 10.31128/AFP-10-17-4372 // *Aust J Gen Pract*. – 2018. – Vol. 47 (7). – P. 477–482.
237. Managing frostbite / M. J. Hallam, T. Cubison, B. Dheansa [et al.]. – DOI 10.1136/bmj.c5864 // *BMJ*. – 2010. – Vol. 341. – P. c5864.
238. Martel-Arquette, A. Management of Severe Frostbite in a Grey-Headed Parrot (*Poicephalus fuscicollis suahelicus*) / A. Martel-Arquette, C. Mans, K. Sladky. – DOI 10.1647/2015-100 // *J Avian Med Surg*. – 2016. – Vol. 30 (1). – P. 39–45.
239. McIntosh, S. E. Wilderness medical society practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite: 2014 update / S. E. McIntosh, M. Opacic, L. Freer // *Wilderness Environ Med*. – 2014. – Vol. 25 (4). – P. 43–54.

240. McLeron, K. State of Alaska. Cold Injury Guidelines / K. McLeron. – 7th ed. – Department of Health and Social Services Division of Public Health Section of Community Health and EMS, 2003.
241. McMahan, J. A. Cold weather issues in sideline and event management / J. A. McMahan, A. Howe. – DOI 10.1249/JSR.0b013e3182578783 // *Curr Sports Med Rep.* – 2012. – Vol. 11 (3). – P. 135–141.
242. Mechanism-Based Treatment Strategies for IBD: Cytokines, Cell Adhesion Molecules, JAK Inhibitors, Gut Flora, and More / P. Schreiner, M. F. Neurath, S.C. Ng [et al.]. – DOI 10.1159/000500721 // *Inflammatory Diseases.* – 2019. – Vol. (3). – P. 79–96.
243. Medicinal plants in traumatic brain injury: Neuroprotective mechanisms revisited / Z. Keshavarzi, F. Shakeri, G. E. Barreto [et al.]. – DOI 10.1002/biof.1516 // *Biofactors.* – 2019. – Vol. 45 (4). – P. 517–535.
244. Microangiography to monitor treatment outcomes following severe frostbite injury to the hands / T. Masters, S. Omodt, J. Gayken, [et al.]. – DOI 10.1097/BCR.0000000000000526 // *J Burn Care Res.* – 2018. – Vol. 39 (1). – P. 162–167.
245. Microangiography: An Alternative Tool for Assessing Severe Frostbite Injury / A. M. Lacey, R. M. Fey, J. R. Gayken [et al.]. – DOI 10.1093/jbcr/irz112 // *J Burn Care Res.* – 2019. – Vol. 40 (5). – P. 566–569.
246. Mohr, W. J. Cold injury / W. J. Mohr, K. Jenabzadeh, D. H. Ahrenholz. – DOI 10.1016/j.hcl.2009.06.004 // *Hand Clin.* – 2009. – Vol. 25 (4). – P. 481–496.
247. Moncada, S. Retraction: Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages / S. Moncada, FY. J. Liew. – DOI 10.4049/jimmunol.1290047 // *Immunol.* – 2012. – Vol. 189 (6). – P. 3260.
248. Myeloid-related protein 8/14 and the risk of cardiovascular death or myocardial infarction after an acute coronary syndrome in the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy: Thrombolysis in Myocardial Infarction (PROVE IT-TIMI 22) trial / D. A. Morrow, Y. Wang, K. Croce [et al.]. – DOI 10.1016/j.ahj.2007.08.018 // *Am Heart J.* – 2008. – Vol. 155 (1). – P. 49–55.

249. Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque / I. Rashid, G. Maghzal, Y. Chen [et al.]. – DOI 10.1093/eurheartj/ehy419 // *European Heart Journal*. – 2018. – Vol. 393. – P. 3010–3310.
250. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein / B. Shao, M. Oda, J. Oram, J. Heinecke. – DOI 10.1021/tx9003775 // *Chemical Research in Toxicology*. – 2010. – Vol. (23). – P. 447–454.
251. Myeloperoxidase-oxidized high density lipoprotein impairs atherosclerotic plaque stability by inhibiting smooth muscle cell migration / B. Zhou, L. Zu, Y. Chen [et al.]. – DOI 10.1186/s12944-016-0388-z // *Lipids Health Disease*. – 2017. – Vol. (163). – P. 170–180.
252. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs / H. Nagase, R. Visse, G. Murphy // *Cardiovasc Res*. – 2006. - Vol. 15(3). – P. 562-73. DOI 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
253. Napoli, C. Nitric oxide and atherosclerosis / C. Napoli, L J. Ignarro // *Nitric Oxide*. – 2001. – Vol. 5. – P. 88–97.
254. Neurovascular hand symptoms in relation to cold exposure in northern Sweden: a population-based study / A. Stjernbrandt, B. Björ, M. Andersson [et al.]. – DOI 10.1007/s00420-017-1221-3 // *Int Arch Occup Environ Health*. – 2017. – Vol. 90 (7). – P. 587–595.
255. Nicholls, S. Myeloperoxidase and cardiovascular disease / S. Nicholls, S. Hazen. – DOI 10.1016/j.jcmg.2009.05.012 // *Vascular Biology*. – 2005. – Vol. (25). – P. 1102–1111.
256. Norheim, A. J. Frostbite in the Norwegian Armed Forces / A. J. Norheim, E. K. Borud. – DOI 10.4045/tidsskr.17.1070 // *Tidsskr Nor Laegeforen*. – 2018. – Vol. 138 (14). – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30234269/> (date of the application: 17.10.2019).
257. Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules / S. Della Bella, M. Molteni, C. Mocellin [et al.] // *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. – 2001. – Vol. 65 (2-3). – P. 73–83.

258. Novel Xyloglucan Sheet for the Treatment of Deep Wounds: Preparation, Physicochemical Characteristics, and in Vivo Healing Effects / K. Hirose, M. Sasatsu, T. Toraishi, H. Onishi. – DOI 10.1248/bpb.b18-00764 // *Biology Pharmacology Bull.* – 2019. – Vol. 42 (8). – P. 1409–1414.
259. Nygaard, R. M. Frostbite in the United States: An Examination of the National Burn Repository and National Trauma Data Bank / R. M. Nygaard, F. W. Endorf. – DOI 10.1093/jbcr/irx048 // *J Burn Care Res.* – 2018. – Vol. 39 (5). – P. 780–785.
260. Ohki, M. Oral frostbite due to dry ice / M. Ohki, J. Ishikawa, S. Kikuchi. – DOI 10.1177/000348941212101009 // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 2012. – Vol. 121 (10). – P. 675–677.
261. Out of the cold: management of hypothermia and frostbite / J. Biem, N. Koehncke, D. Classen, J. Dosman // *CMAJ.* – 2003. – Vol. 168 (3). – P. 305–311.
262. Pathophysiologic Determination of Frostbite Under High Altitude Environment Simulation in Sprague-Dawley Rats / J. Hu, H. Li, X. Geng [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2016.03.004 // *Wilderness Environ Med.* – 2016. – Vol. 27 (3). – P. 355–363.
263. Pourheydar, B. Exercise improves aging-related decreased angiogenesis through modulating VEGF-A, TSP-1 and p-NF-H protein levels in myocardiocytes / B. Pourheydar, A. Biabanghard, R. Azari, N. Khalaj, L. Chodari // *J Cardiovasc Thorac Res.* – 2020. – Vol. 12 (2). – P. 129-135. DOI: 10.34172/jcvtr.2020.21.
264. Pediatric frostbite: A 10-year single-center retrospective study / R. Boles, J. P. Gawaziuk, N. Cristall, S. Logsetty. – DOI 10.1016/j.burns.2018.04.002 // *Burns.* – 2018. – Vol. 44 (7). – P. 1844–1850.
265. Pentoxifylline. Adjunctive therapy in the treatment of pedal frostbite / D. W. Jr. Hayes, V. J. Mandracchia, C. Considine, G. E. Webb // *Clin Podiatr Med Surg.* – 2000. – Vol. 17 (4). – P. 715–722.
266. Petrone, P. Surgical management and strategies in the treatment of hypothermia and cold injury / P. Petrone, E. J. Kuncir, J. A. Asensio // *Emerg Med Clin North Am.* – 2003. – Vol. 21 (4). – P. 1165–1178.

267. Pino, M. Association between MMP1 and MMP9 activities and ICAM1 cleavage induced by tumor necrosis factor in stromal cell cultures from eutopic endometria of women with endometriosis // *Reproduction*. – 2009. – Vol. 138 (5). – P. 837–847.
268. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study / C. Zoccali, S. Bode-Boger, F. Mallamaci [et al.] // *Lancet*. – 2001. – Vol. 358. – P. 2113–2117.
269. Poole, A. Treatment of severe frostbite with iloprost in northern Canada / A. Poole, J. Gauthier // *CMAJ*. – 2016. – Vol. 188 (17-18). – P. 1255–1258.
270. Portable hyperbaric chamber and management of hypothermia and frostbite: an evident utilization / E. Cauchy, S. Leal, M. A. Magnan, H. Nespoulet. – DOI 10.1089/ham.2013.1095. PMID: 24673539 // *High Alt Med Biol*. – 2014. – Vol. 15 (1). – P. 95–96.
271. Post, P. W. Frostbite in a pre-Columbian mummy / P. W. Post, D. D. Donner // *Am J Phys Anthropol*. – 1972. – Vol. 37. – P. 187–191.
272. Potential new treatment for non-freezing cold injury: is Iloprost the way forward? / A. M. Ionescu, S. Hutchinson, M. Ahmad, C. Imray. – DOI 10.1136/jramc-2016-000672 // *J R Army Med Corps*. – 2017. – Vol. 163 (5). – P. 361–363.
273. Poulakidas, S. J. Pediatric Frostbite Treated by Negative Pressure Wound Therapy / S. J. Poulakidas, A. Kowal-Vern, C. Atty. – DOI 10.1097/BCR.0000000000000284 // *J Burn Care Res*. – 2016. – Vol. 37 (5). – e489-92.
274. Powell, T. Development of Second-degree Frostbite in Two Service Members Wearing Issued Cold Weather Footgear Traversing Sea Ice / T. Powell. – DOI 10.1093/milmed/usaa384 // *Mil Med*. – 2020. – Vol. 3. – P. 384.
275. Product tipe: Recombinant Proteins, Cytokines, Growth Factors. – URL: <https://www.biolegend.com> (дата обращения: 20.02.2020).
276. Protection against cold in prehospital care: evaporative heat loss reduction by wet clothing removal or the addition of a vapor barrier--a thermal manikin study / O. Henriksson, P. Lundgren, K. Kuklane [et al.]. – DOI 10.1017/S1049023X12000210 // *Prehosp Disaster Med*. – 2012. – Vol. 27 (1). – P. 53–58.



277. Protection against cold in prehospital care: wet clothing removal or addition of a vapor barrier / O. Henriksson, P. J. Lundgren, K. Kuklane [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2014.07.001 // *Wilderness Environ Med.* – 2015. – Vol. 26 (1). – P. 11–20.
278. Protective Effect of Extract of *Ginkgo biloba* 761 against Frostbite Injury in Rats / T. Aizawa, M. Kuwabara, S. Kubo [et al.]. – DOI 10.1097/PRS.00000000000005648 // *Plast Reconstr Surg.* – 2019. – Vol. 143 (6). – P. 1657–1664.
279. Proton Pump Inhibitors and Dabigatran Therapy: Impact on Gastric Bleeding and Dabigatran Plasma Levels / T. Bolek, M. Samos, I. Skornova [et al.]. – DOI 10.1055/s-0039-1695735 // *Semin Thromb Hemost.* – 2019. – Vol. 45 (8). – P. 846–850.
280. Rainsford, K. D. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety // *Inflammopharmacology.* – 2009. – Vol. 17 (6). – P. 275–342.
281. Rajendran, P. The vascular endothelium and human diseases / P. Rajendran, I. Rengarajan, J. Thangavel. – DOI 10.7150/ijbs.7502 // *Int. J. Biol. Sci.* – 2013. – № 9 (10). – C. 1057–1069.
282. Ramadan, M. Z. The Effects of Industrial Protective Gloves and Hand Skin Temperatures on Hand Grip Strength and Discomfort Rating / M. Z. Ramadan. – DOI 10.3390/ijerph14121506 // *Int J Environ Res Public Health.* – 2017. – Vol. 14 (12). – P. 1506.
283. Reduction of the incidence of amputation in frostbite injury with thrombolytic therapy / K. J. Bruen, J. R. Ballard, S. E. Morris [et al.] // *Arch Surg.* – 2007. – Vol. 142 (6). – P. 546–551.
284. Reitan, I. Patient-reported quality of life and hand disability in elderly patients after a traumatic hand injury – a retrospective study / I. Reitan, L. B. Dahlin, H. E. Rosberg. – DOI 10.1186/s12955-019-1215-9 // *Health qual life outcomes.* – 2019. – Vol. 17 (1). – P. 148.

285. Relevance of TRPA1 and TRPM8 channels as vascular sensors of cold in the cutaneous microvasculature / Y. Pan, D. Thapa, L. J. Baldissera [et al.]. – DOI 10.1007/s00424-017-2085-9 // *Pflugers Arch.* – 2018. – Vol. 470 (5). – P. 779–786.
286. Research progress in the pathogenic mechanisms and imaging of severe frostbite / Y. Gao, F. Wang, W. Zhou, S. Pan. – DOI 10.1016/j.ejrad.2021.109605 // *Eur J Radiol.* – 2021. – Vol. 137. – P. 109605.
287. Retrospective study of 70 cases of severe frostbite lesions: a proposed new classification scheme / E. Cauchy, E. Chetaille, V. Marchand, B. Marsigny // *Wilderness Environ Med.* – 2001. – Vol. 12 (4). – P. 248–255.
288. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine / V. P. Valkonen, H. Paiva, J. T. Salonen [et al.] // *Lancet.* – 2001. – Vol. 358. – P. 2127–2128.
289. Rose, N. R. Critical Cytokine Pathways to Cardiac Inflammation // *J Interferon Cytokine Res.* – 2011. – Vol. 31. – P. 705–710.
290. Saemi, A. M. Treatment of bilateral hand frostbite using transcatheter arterial thrombolysis after papaverine infusion / A. M. Saemi, J. M. Johnson, C. S. Morris // *Cardiovasc Intervent Radiol.* – 2009. – Vol. 32 (6). – P. 1280–1283.
291. Sakiyama, M. Preventable frostbite due to cold pack / M. Sakiyama, Y. Kawakubo. – DOI 10.1111/iwj.12105 // *Int Wound J.* – 2015. – Vol. 12 (3). – P. 366.
292. Serum E-selectin concentration is associated with risk of metabolic syndrome in females / C. H. Lee, F. C. Kuo, W. H. Tang [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0222815 // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14 (9), № 8. – P. 15.
293. Shah, A. Management of pediatric hypothermia and peripheral cold injuries in the emergency department / A. Shah, M. Madhok // *Pediatr Emerg Med Pract.* – 2019. – Vol. 16 (1). – P. 1–16.
294. Shenaq, D. S. Cold Injuries / D. S. Shenaq, L. J. Gottlieb. – DOI 10.1016/j.hcl.2016.12.003 // *Hand Clin.* – 2017. – Vol. 33 (2). – P. 257–267.
295. Shitzer, A. Paradox: increased blood perfusion to the face enhances protection against frostbite while it lowers wind chill equivalent temperatures / A.

Shitzer. – DOI 10.1007/s00484-006-0082-3 // Int J Biometeorol. – 2007. – Vol. 51 (5). – P. 383–393.

296. Ski-Everest (8848 m) Expedition: Digit Skin Temperature Responses to Cold Immersion May Reflect Susceptibility to Cold Injury / J. Gorjanc, S. A. Morrison, A. C. McDonnell [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2019.01.002 // Wilderness Environ Med. – 2019. – Vol. 30 (2). – P. 141–149.

297. Skin conditions in figure skaters, ice-hockey players and speed skaters: part II - cold-induced, infectious and inflammatory dermatoses / B. E. Tlougan, A. J. Mancini, J. A. Mandell [et al.]. – DOI 10.2165/11592190-000000000-00000 // Sports Med. – 2011. – Vol. 41 (11). – P. 967–984.

298. Sobacchi C. The RANKL-RANK Axis: A Bone to Thymus Round Trip / C. Sobacchi, C. Menale, A. Villa // Front Immunol.- 2019. - Vol. 10. – P. 629. DOI 10.3389/fimmu.2019.00629.

299. SPECT imaging of inflammatory response in ischemic-reperfused rat hearts using a <sup>99m</sup>Tc-labeled dual-domain cytokine ligand / Z. Liu, C. Barber, L. Wan [et al.] // J Nucl Med. – 2013. – Vol. 54. – P. 2139–2145.

300. SPECT/CT in the evaluation of frostbite / C. Kraft, J. D. Millet, S. Agarwal [et al.]. – DOI 10.1097/BCR.0000000000000359 // J Burn Care Res. – 2017. – Vol. 38 (1). – P. 227–234.

301. STAT3 Mediates the Differential Effects of Oncostatin M and TNF $\alpha$  on RA Synovial Fibroblast and Endothelial Cell Function / M. M. Hanlon, T. Rakovich, C. C. Cunningham [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02056 // Front Immunology. – 2019. – Vol. (28). – P. 10–20.

302. Strijdom, H. Endothelial dysfunction: are we ready to heed the vasculature's early-warning signal // Cardiovasc Journal. – 2012. – Vol. 23(4). – P. 184–185.

303. Tessler, M. H. Avoiding frostbite: It helps to learn from others / M. H. Tessler, N. D. Goodman, M. C. Frank. – DOI 10.1017/S0140525X17000280 // Behav Brain Sci. – 2017. – Vol. 40. – e279.

304. The Effect of a 300 mBar Increase in Barometric Pressure on Digital Microcirculation in Healthy Subjects Exposed to High Altitude: Is the Use of a Portable Hyperbaric Chamber to Treat Frostbite and/or Hypothermia in the Field Indicated? (Flow\_Pulse Study) / Y. Savina, S. Leal, P. Zellner [et al.]. – DOI 10.1089/ham.2018.0069 // High Alt Med Biol. – 2019. – Vol. 20 (1). – P. 56–60.
305. The effect of myeloperoxidase isoforms on biophysical properties of red blood cells / E. V. Shamova, I. V. Gorudko, D. V. Grigorieva [et al.]. – DOI 10.1007/s11010-019-03654-0 // Molecular and Cell Biochemistry. – 2019. – Vol. (21). – P. 45–49.
306. The emerging role of tissue plasminogen activator in the management of severe frostbite / A. E. Ibrahim, J. Goverman, K. A. Sarhane [et al.] // J Burn Care Res. – 2015. – Vol. 36 (2). – P. 62–66.
307. The evolution of the Helsinki frostbite management protocol / A. Lindford, J. Valtonen, M. Hult [et al.] // Burns. – 2017. – Vol. 43 (7). – P. 1455–1463.
308. The Hennepin score: quantification of frostbite management efficacy / R. M. Nygaard, A. B. Whitley, R. M. Fey, A. L. Wagner // J Burn Care Res. – 2016. – Vol. 37 (4). – P. 317–322.
309. The use of intravenous tPA for the treatment of severe frostbite / L. M. Jones, R. A. Coffey, M. P. Natwa, J. K. Bailey // Burns. – 2017. – Vol. 43 (5). – P. 1088–1096.
310. The utility of bone scintigraphy with SPECT/CT in the evaluation and management of frostbite injuries / M. S. Manganaro, J. D. Millet, R. K. Brown [et al.]. – DOI 10.1259/bjr.20180545 // Br J Radiol. – 2019. – Vol. 92 (1094). – P. 20180545.
311. The value of technetium 99 scintigraphy in the prognosis of amputation in severe frostbite injuries of the extremities: a retrospective study of 92 severe frostbite injuries / E. Cauchy, B. Marsigny, G. Allamel [et al.] // J Hand Surg Am. – 2000. – Vol. 25 (5). – P. 969–978.
312. Thermal comfort sustained by cold protective clothing in Arctic open-pit mining-a thermal manikin and questionnaire study / K. Jussila, S. Rissanen, A. Aminoff

[et al.]. – DOI 10.2486/indhealth.2017-0154 // *Ind Health*. – 2017. – Vol. 55 (6). – P. 537–548.

313. Thermal Injuries in Veterinary Forensic Pathology / P. Wohlsein, M. Peters, C. Schulze, W. Baumgärtner. – DOI 10.1177/0300985816643368 // *Vet Pathol*. – 2016. – Vol. 53 (5). – P. 1001–1017.

314. Thom, S. R. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy // *Plast Reconstr Surg*. – 2011. – Vol. 127, suppl 1. – P. 131–141.

315. Thrombolytic Salvage of Threatened Frostbitten Extremities and Digits: A Systematic Review / J. Drinane, V.S. Kotamarti, C. O'Connor [et al.]. – DOI 10.1093/jbcr/irz097 // *J Burn Care Res*. – 2019. – Vol. 40 (5). – P. 541–549.

316. Tikuisis, P. Prediction of facial cooling while walking in cold wind / P. Tikuisis, M. B. Ducharme, D. Brajkovic. – DOI 10.1016/j.compbimed.2006.11.009 // *Comput Biol Med*. – 2007. – Vol. 37 (9). – P. 1225–1231.

317. Tilney, P. A 63-Year-Old Man With Frostbite / P. Tilney, M. Choate, P. Perrault. – DOI 10.1016/j.amj.2019.03.017 // *Air Med J*. – 2019. – Vol. 38 (4). – P. 248–250.

318. Time matters in severe frostbite: assessment of limb/digit salvage on the individual patient level / R. M. Nygaard, A. M. Lacey, A. Lemere [et al.] // *J Burn Care Res*. – 2017. – Vol. 38 (1). – P. 53–59.

319. Treatment of 568 patients with frostbite in northeastern China with an analysis of rate of amputation / H. Su, Z. Li, Y. Li [et al.] // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. – 2015. – Vol. 31 (6). – P. 410–415.

320. Treatment of frostbite with guanethidine / R. Kaplan, P. Thomas, H. Tepper, B. Strauch // *Lancet. Interv Radiol*. – 2016. – Vol. 27 (8). – P. 1228e35.

321. Treatment of Frostbite With Hyperbaric Oxygen Therapy: A Single Center's Experience of 22 Cases / A. Ghumman, H. St Denis-Katz, R. Ashton [et al.] // *Wounds*. – 2019. – Vol. 31 (12). – P. 322–325.

322. Treatment of frostbite with intra-arterial prostaglandin E1 / R. A. Yeager, T. W. Champion, J. C. Kerr [et al.] // *Am Surg*. – 1983. – Vol. 49 (12). – P. 665–667.

323. Twomey, J. A. An open-label study to evaluate the safety and efficacy of tissue plasminogen activator in treatment of severe frostbite / J. A. Twomey, G. L. Peltier, R. T. Zera // *J Trauma*. – 2005. – Vol. 59 (6). – P. 1354–1355.
324. Update: Cold weather injuries, active and reserve components, U.S. Armed Forces, July 2013-June 2018 / Armed Forces Health Surveillance Branch // *MSMR*. – 2018. – Vol. 25 (11). – P. 10–17.
325. Update: Cold weather injuries, active and reserve components, U.S. Armed Forces, July 2014-June 2019 / Ricardford R Connor // *MSMR*. – 2019. – Vol. 26 (11). – P. 17–26.
326. Urata, Y. Chilblain lupus during treatment with golimumab for rheumatoid arthritis / Y. Urata, T. Honda, Y. Kaku, K. Kabashima. – DOI 10.1111/1346-8138.14884 // *J Dermatol*. – 2019. – Vol. 46 (9). – e314-e315.
327. Urban Frostbite: Strategies for Limb Salvage / D. S. Shenaq, M. Beederman, A. O'Connor [et al.]. – DOI 10.1093/jbcr/irz062 // *J Burn Care Res*. – 2019. – Vol. 40 (5). – P. 613–619.
328. Use of intra-arterial thrombolytic therapy for acute treatment of frostbite in 62 patients with review of thrombolytic therapy in frostbite / T. Gonzaga, K. Jenabzadeh, C. P. Anderson [et al.]. – DOI 10.1097/BCR.0000000000000245 // *J Burn Care Res*. – 2016. – Vol. 37 (4). – P. 323–334.
329. Vasospasm Is a Consistent Finding in Pernio (Chilblains) and a Possible Clue to Pathogenesis / V. Shahi, D. A. Wetter, J. A. Cappel [et al.]. – DOI 10.1159/000437224 // *Dermatology*. – 2015. – Vol. 231 (3). – P. 274–279.
330. Wagner, C. Thrombolytic therapy in the acute management of frostbite injuries / C. Wagner, C. J. Pannucci // *Air Med J*. – 2011. – Vol. 30 (1). – P. 39–44.
331. Wang, M. L. Comparative Analysis of Chilblain Lupus Erythematosus and Idiopathic Perniosis: Histopathologic Features and Immunohistochemistry for CD123 and CD30 / M. L. Wang, M. P. Chan. – DOI 10.1097/DAD.0000000000000945 // *Am J Dermatopathol*. – 2018. – Vol. 40 (4). – P. 265–271.

332. Wexler, A. The use of thrombolytic therapy in the treatment of frostbite injury / A. Wexler, S. Zavala. – DOI 10.1097/BCR.0000000000000512 // *J Burn Care Res.* – 2017. – Vol. 38 (5). – P. 877–881.
333. Wilderness Medical Society Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Frostbite: 2019 Update / S. E. McIntosh, L. Freer, C. K. Grissom [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2019.05.002 // *Wilderness Environ Med.* – 2019. – Vol. 30 (4S). – S19–S32.
334. Wilderness Medical Society Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Frostbite: 2019 Update / S. E. McIntosh, L. Freer, C. K. Grissom [et al.]. – DOI 10.1016/j.wem.2019.05.002 // *Wilderness Environ Medicine.* – 2019. – Vol. 27 (4). – P. 404–408.
335. Wilderness Medical Society practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite: 2014 update / S. E. McIntosh, M. Opacic, L. Freer [et al.] // *Wilderness Environ Med.* – 2014. – Vol. 25, 4 suppl. – S43e54.
336. Yanagisawa, H. Hypothermia, chilblain and frostbite // *Nihon Rinsho.* – 2013. – Vol. 71 (6). – P. 1074–1078.
337. Zafren, K. Frostbite: prevention and initial management / K. Zafren. – DOI 10.1089/ham.2012.1114 // *High Alt Med Biol.* – 2013. – Vol. 14 (1). – P. 9–12.
338. Zhang, H. Role of Matrix Metalloproteinases and Therapeutic Benefits of Their Inhibition in Spinal Cord Injury / H. Zhang. – DOI 10.1007/s13311-011-0038-0 // *Neurotherapeutics.* – 2011. – Vol. 8. – P. 206–220.
339. Zilliox, LA. Neuropathic Pain / L.A. Zilliox // *Continuum (Minneap Minn).* - 2017. - Vol .2. – P. - 512-532. DOI 10.1212/CON.0000000000000462. PMID: 28375916.