

ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ СЕКРЕЦИЯ ВАЗОАКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЕ КОНЕЧНОСТЕЙ

К.Г. Шаповалов, В.А. Сизоненко, Е.А. Томина, Ю.А. Витковский

ГОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия Росздрава»,
ректор – засл. врач РФ, д.м.н. профессор А.В. Говорин
г. Чита

Для определения уровня эндотелина-1 и нитритов в крови обследовано 60 мужчин в возрасте от 17 до 45 лет с отморожениями нижних конечностей II-IV степеней. У пострадавших в разные периоды травмы определялась концентрация нитритов в крови по методу П.П. Голикова [2] и эндотелина-1 с помощью иммуноферментного анализа. Методом лазерной доплеровской флоуметрии регистрировались колебания кровотока. Установлено, что в крови пациентов в 2,4–4,5 раза возрастает уровень эндотелина-1, в 1,6–2,4 раза уменьшается концентрация нитритов. При этом соотношение нитриты/эндотелин-1 в крови прямо влияет на максимальную амплитуду колебаний кровотока в эндотелиальном диапазоне ($r=0,97$, $p<0,01$).

The aim was to study the level of endothelin-1 and nitrites in blood of 60 men aged from 17 to 45 with the local frostbites of low extremities of II-IV degrees. The concentration of nitrites in blood in the different periods of the trauma was detected by P. Golikov's method [2]. Endothelin-1 was detected by ELISA. Blood flow fluctuations were registered by the laser Doppler flowmetria method. It was determined, that in patients' blood the endothelin-1 level increases in 2,4–4,5, the concentration of nitrites decreases in 1,6–2,4. Thus, the nitrites/endothelin-1 ratio directly influences on the maximal amplitude of blood flow fluctuations in endothelial range ($r=0,97$, $p<0,01$).

Введение

Местная холодовая травма сопровождается морфологическими и функциональными изменениями в тканях пораженного сегмента конечности. Причем нервы и эндотелий сосудов, ввиду высокой дифференцированности, наиболее чувствительны к гипоксии и действию низких температур [1, 5]. На фоне последующих нарушений состояния систем микроциркуляции и гемостаза зона некроза при отморожениях имеет тенденцию к расширению, а течение раневого процесса может приобретать затяжной характер [5]. Эндотелий участвует в регуляции тонуса и атромбогенности стенки сосуда, систем свертывания крови и фибринолиза, ангиогенеза [3, 6, 7]. Поэтому его функциональные изменения могут объяснять патофизиологические сдвиги в тканях при отморожениях. Вместе с тем, состояние эндотелиальной секреции вазоактивных веществ и их вклад в регуляцию тонуса сосудов при местной холодовой травме изучены недостаточно.

Цель работы: исследовать содержание эндотелина-1 и нитритов в крови больных в разные периоды местной холодовой травмы конечностей.

Материал и методы

При работе с людьми соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (1964). Обследовано 72 мужчины в возрасте 17–45 лет с отморожениями нижних конечностей II-IV степеней. В 2006-2008 гг. они находились на стационарном лечении в областном центре термической травмы на базе городской клинической больницы №1 г. Читы. Распределение по группам проводилось в зависимости от периода клинического течения. Некоторые больные обследовались повторно в разные сроки после травмы.

Первую группу составили 12 больных, поступивших в дореактивном периоде местной холодовой травмы [8]; вторую – 22 в раннем реактивном периоде; третью – 38 в позднем реактивном периоде отморожений, то есть через 48 и более часов с момента поражения холодом. В контрольную группу вошли 12 здоровых добровольцев.

У пострадавших с холодовой травмой регистрировались колебания кровотока методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [6].

С помощью аппарата ЛАКК-02 (НПП «Лазма», Россия) ЛДФ-граммы записывались в течение 7-10 минут. Датчик устанавливался на наружной поверхности в средней трети голени. В данной зоне, как правило, не отмечается признаков холодового поражения. Зондировали лазерным излучением на длине волны 0,63 мкм. Устанавливался показатель микроциркуляции (ПМ), после вейвлет-преобразования прикладной компьютерной программой осцилляций микрокровотока получали максимальную амплитуду эндотелиального диапазона колебаний (Аэ).

Для оценки функции эндотелия больным выполнялась окклюзионная проба по следующей схеме. Манжета тонометра фиксировалась в нижней трети бедра, в процессе регистрации колебаний кровотока нагнетался воздух в манжету до уровня, превышающего систолическое артериальное давление. Далее в течение 3 минут поддерживалась окклюзия артериального кровотока, после чего воздух из манжеты выпускался. Устанавливался резерв капиллярного кровотока (РКК), равный отношению максимального значения показателя микроциркуляции после восстановления кровообращения к его исходному уровню [6].

для Windows с применением критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

У пациентов с отморожениями нижних конечностей в дореактивном периоде травмы выявлено снижение ПМ в 2,8 раза ($p < 0,001$) и РКК в 2,3 раза ($p < 0,001$). Величина максимальной амплитуды колебаний кровотока в эндотелиальном диапазоне относительно группы контроля не менялась ($p > 0,05$) (табл. 1).

Установлено, что при этом в крови пострадавших с холодовой травмой в 4,5 раза возрастала концентрация эндотелина-1 ($p < 0,001$), а уровень ближайших стабильных метаболитов оксида азота – нитритов – оставался на уровне контроля ($p > 0,05$). Как следствие, соотношение нитриты/эндотелин-1 уменьшалось в 4,6 раза ($p < 0,001$) (табл. 2).

В данном периоде травмы отмечается тотальный спазм артерий и артериол [5]. В связи с этим значительно сокращается скорость и объем крови в микроциркуляторном русле, снижается напряжение сдвига на сосудистую стенку [6]. Несмотря на резкое увеличение содержания в крови эндотелина-1, концентрация нитритов остается на уровне контроля, при этом осцилля-

Таблица 1

Показатели осцилляций кровотока ($M \pm m$)

Показатели	Группы			
	Контрольная, n=12	I, n=12	II, n=22	III, n=38
ПМ, пф. ед.	5,92±0,74	2,14±0,73 $p < 0,001$	6,35±0,53 $p > 0,05$	3,59±0,56 $p < 0,05$
Аэ, пф. ед.	0,39±0,03	0,42±0,08 $p > 0,05$	0,52±0,04 $p < 0,05$	0,24±0,04 $p < 0,05$
РКК, %	264±19	115±8 $p < 0,001$	173±24 $p < 0,05$	140±27 $p < 0,05$

p – достоверность относительно контрольной группы.

Определение концентрации эндотелина-1 выполнялось с помощью наборов реагентов фирмы «Biomedica» (Австрия) методом твердофазного ИФА в соответствии с инструкцией производителя. Исследование нитритов крови осуществлялось по методу П.П. Голикова [2]. Рассчитывалось отношение концентрации нитритов к эндотелину-1 в разные периоды течения холодовой травмы.

Статистический и регрессионный анализы проведены с помощью программы Statistica 6.0

ции кровотока, обусловленные эндотелиальной активностью, соответствуют величине таковых у здоровых людей. Очевидно, что действие низкотемпературного фактора приводит к релизingu биологически активных молекул, содержащихся в эндотелии, но не сопровождается усилением их продукции. На фоне значительного обеднения приносящего артериального кровотока и, возможно, изменения структуры фосфолипидных биомембран сосудистой стенки пресорное влияние эндотелина-1 на последнюю оста-

Концентрация вазоактивных молекул в крови ($M \pm m$)

Показатели	Группы			
	Контрольная, n=12	I, n=12	II, n=22	III, n=38
Нитриты, мкмоль/л	4,1±0,17	3,9±0,38 p>0,05	2,6±0,12 p<0,001	1,7±0,1 p<0,001
эндотелин-1, фмоль/мл	0,22±0,07	0,99±0,07 p<0,001	0,53±0,06 p<0,01	0,90±0,16 p<0,05
Нитриты/ эндотелин-1×10 ⁶	18,6±0,11	4,03±0,26 p<0,001	4,91±0,15 p<0,001	1,89±0,32 p<0,001

Примечание: p – достоверность относительно контрольной группы.

ется без видимого ответа. Такое рассуждение подтверждается результатами окклюзионной пробы – снижение РКК в данный период обусловлено общим уменьшением объема циркулирующей крови и низкой секреторной активностью эндотелия, в частности в отношении оксида азота [3, 6, 9].

У пациентов с отморожениями конечностей в раннем реактивном периоде травмы ПМ восстанавливался до значений здоровых людей ($p > 0,05$), максимальная амплитуда осцилляций кровотока в эндотелиальном диапазоне возрастала в 1,3 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 1). При этом отмечалось снижение уровня нитритов в крови в 1,6 раза ($p < 0,001$), а концентрация эндотелина-1 в 2,4 раза превышала данные контрольных исследований ($p < 0,001$). Соотношение нитриты/эндотелин-1 у больных уменьшалось в 3,8 раза ($p < 0,001$) (см. табл. 2). После восстановления температуры и метаболизма в тканях зоны криопоражения и деструкции развивалось воспаление [1, 8]. При этом в кровеносное русло поступает множество биологически активных соединений, в том числе обладающих влиянием на тонус сосудов. Как следствие, возрастает общий ток крови в пораженном сегменте конечности и напряжение сдвига. Увеличение максимальной амплитуды осцилляций эндотелиального генеза свидетельствует о его активном участии в синтезе и высвобождении вазоактивных молекул [6]. Тем не менее, концентрация нитритов в крови, как ближайших стабильных метаболитов оксида азота, уменьшается. Молекула нитроксида, как известно, позиционируется большинством исследователей в качестве основного вазорелаксирующего фактора эндотелиального происхождения [3]. Однако результирующее воздействие на сосудистый тонус при отморожениях в раннем реактивном периоде, очевидно, связано также с некоторым снижением рилизинга эндоте-

лина-1 и влиянием других активных в отношении гладкой мускулатуры сосудов соединений (ангиотензин-II, простаглицлин, кинины, тромбоксан, адренормедуллин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор и др.) [3]. На этом фоне РКК имеет тенденцию к восстановлению, но остается меньше уровня контроля в 1,4 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 1).

Установлено, что у больных с отморожениями в позднем реактивном периоде ПМ уменьшался в 1,6 раза ($p < 0,05$), РКК – в 1,9 раза ($p < 0,05$), при этом максимальная амплитуда эндотелиального диапазона колебаний сосудистой стенки сокращалась в 1,6 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 1). На фоне «затухания» воспалительной реакции у пострадавших с местной холодовой травмой вновь регистрируются признаки обеднения микрокровотока. В генезе повышения сосудистого тонуса, в данном случае, значительный вклад вносят вазоактивные факторы эндотелиального происхождения. Так, в крови пострадавших в наибольшей степени снижалась концентрация нитритов – в 2,4 раза ($p < 0,001$), причем уровень эндотелина-1 превышал контрольные значения в 4,1 раза ($p < 0,001$), а соотношение нитриты/эндотелин-1 уменьшалось в 9,8 раз ($p < 0,001$) (см. табл. 2). Резкому уменьшению максимальной амплитуды колебаний эндотелиального диапазона соответствуют значительное снижение концентрации нитритов и возрастание уровня эндотелина-1 в крови. Так как высокая концентрация эндотелина-1 поддерживается в течение длительного времени, возможно, проявляется его ингибирующее влияние на экспрессию синтазы оксида азота и образование нитроксида в стенке сосуда [3]. Соотношение нитриты/эндотелин-1 при этом достигает минимума. Снижение РКК связано как с изменением концентрации вазоактивных молекул, так и с уменьшением секреторного потенциала эндотелия в

результате действия холода, медиаторов воспаления, нарушения периферической иннервации [5, 6].

Нами установлена средней силы прямая связь между максимальной амплитудой колебаний кровотока в эндотелиальном диапазоне и уровнем нитритов в крови больных с отморожениями ($r=0,59$, $p<0,05$). При этом между концентрацией эндотелина-1 в крови пострадавших с холодовой травмой и амплитудой осцилляций эндотелиального генеза выявлена средней силы обратная связь ($r=-0,64$, $p<0,01$). Весьма сильная корреляционная связь обнаружена между колебаниями кровотока, вызванными эндотелиальной активностью и соотношением уровня основных вазоконстрикторов и вазодилататоров (нитриты/эндотелин-1) ($r=0,97$, $p<0,01$). Это подтверждает особую роль последних в регуляции сосудистого тонуса. Сопоставление результатов исследования колебаний кровотока в других анатомических областях (I межплюсневый промежуток, пальцы) при отморожениях нижних конечностей и уровня вазоактивных соединений характеризовалось значительно меньшей по силе связью. В таких местах, как правило, имеется криовоздействие, поэтому в зоне расположения датчика развиваются процессы воспаления. Вследствие этого на результаты анализа осцилляций кровотока, связанные с активностью в различных диапазонах, «наслаиваются» колебания, соответствующие непосредственно воспалительной реакции.

Изменение уровня вазоактивных молекул, вызывающее повышение тонуса сосудов в позднем реактивном периоде травмы, приводит к «обеднению» микрокровотока в регионе, подвергнутому действию холода. В результате течение раневого процесса при отморожениях нередко приобретает затяжной вялотекущий характер. Оперативное лечение таких пациентов вызывает определенные трудности в связи с необходимостью проведения повторных некрэктоми и

кожных пластик [1, 5, 8]. Как следствие, ухудшаются функциональные результаты лечения, возрастает длительность пребывания больных в стационаре.

Выводы

1. У больных с местной холодовой травмой нижних конечностей III-IV степеней в крови в 2,4-4,5 раза возрастает уровень эндотелина-1, в 1,6-2,4 раза уменьшается концентрация нитритов.

2. У пострадавших с отморожениями III-IV степеней нижних конечностей соотношение нитриты/эндотелин-1 в крови прямо влияет на максимальную амплитуду колебаний кровотока в эндотелиальном диапазоне.

Литература

1. Вихриев, Б.С. Местные поражения холодом / Б.С. Вихриев, С.Х. Кичемасов, Ю.Р. Скворцов. - Л.: Медицина, 1991. - 192 с.
2. Голиков, П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. - М.: Медпрактика, 2004. - 180 с.
3. Дисфункция эндотелия / под ред. проф. Н.Н. Петрищева. - СПб., 2003. - 184 с.
4. Клименко, О.В. Влияние оксида азота на иммунитет и гемостаз в норме и при некоторых патологических состояниях : автореф. дис. ...канд. мед. наук / Клименко О.В.; ГОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия». - Чита, 2002. - 19 с.
5. Котельников, В.П. Отморожения / В.П. Котельников. - М.: Медицина, 1988. - 256 с.
6. Крупаткин, А.И. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. - М.: Медицина, 2005. - 256 с.
7. Кузник, Б.И. Физиология и патология системы крови / Б.И. Кузник, М.А. Степанов. - Чита, 2002. - 320 с.
8. Сизоненко, В.А. Классификация холодовой травмы / В.А. Сизоненко // Третья конференция по проблеме «Холодовая травма». - СПб., 2002. - С. 202-208.
9. Tercan, M. Decreased serum nitric oxide level in experimental frostbite injury: a preliminary study / M. Tercan, M. Bekerecioglu // Ann. Plast. Surg. - 2002. - Vol. 48, N 1. - P. 107-108.