

ПОВРЕЖДЕНИЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ МЕСТНОЙ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ

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

*Читинская Государственная медицинская академия,
ректор – засл. врач РФ, д.м.н. профессор А.В. Говорин
г. Чита*

Исследовано содержание десквамированных эндотелиальных клеток, TNF α и IL-6 в крови больных в разные периоды местной холодовой травмы. Обследовано 60 мужчин в возрасте 17-50 лет с отморожениями II-IV степеней конечностей. Десквамированные эндотелиоциты подсчитывались методом Hladovec. Концентрации цитокинов определялись иммуноферментным методом. Содержание в крови десквамированных эндотелиоцитов максимально увеличивается в раннем реактивном периоде – $21,2 \pm 1,6$ в 1 мкл ($p < 0,01$). В позднем реактивном периоде их концентрация снижается – $4,9 \pm 0,8$ в 1 мкл ($p > 0,05$). Уровень TNF α и IL-6 в крови больных в раннем реактивном периоде возрастал в 5 и 11 раз, в позднем – в 3 и 8 соответственно. Таким образом, повреждение эндотелия при отморожениях приводит к повышению содержания в крови десквамированных эндотелиальных клеток и провоспалительных цитокинов.

The contents of endothelial cells, TNF α and IL-6 in patients' blood in the different periods of local cold injury were studied. 60 men with the frostbites (II-IV degrees) of low extremities aged 17-50 were examined. Endothelial cells were calculated by Hladovec method. The concentrations of cytokines were detected by ELISA. The contents of endothelial cells in blood maximally grow in early reactive period to $21,2 \pm 1,6$ μ l ($p < 0,01$). In late reactive period their concentration descends to $4,9 \pm 0,8$ μ l ($p > 0,05$). The levels of TNF α and IL-6 in patients' blood in early reactive period increased 5 and 11 times more, in late reactive period – 3 and 8 times more. Thus, the damage of endothelium at frostbites leads to the elevation of the contents of endothelial cells and proinflammatory cytokines in patients' blood.

Введение

Проблема холодовой травмы в настоящее время остается актуальной, несмотря на многолетнее изучение особенностей ее патогенеза и появление новых прогрессивных методов лечения [2, 3, 5]. До сих пор не выяснены механизмы развития некротических изменений в тканях, пораженных низкой температурой [4, 6]. Высокая частота инвалидизации (до 50%) и десятки тысяч пострадавших требуют проведения эффективного лечения данной патологии [2, 5].

Прогнозирование распространенности и глубины поражения всегда являлось первостепенной задачей для определения дальнейшей тактики ведения пациентов. Предлагаемые подходы к решению этой проблемы отличаются сложностью и недостаточной информативностью.

Большое значение в патогенезе холодового поражения имеют расстройства систем микроциркуляции, свертывания крови, фибринолиза и иммунитета [1, 4]. В механизмах развития патологии важное место отводится процессам альтерации эндотелия. Следствием чего могут являться нарушения тканевого обмена.

Целью нашего исследования явилось определение в крови содержания десквамированных эндотелиальных клеток и уровня TNF α , IL-6 у больных в разные периоды местной холодовой травмы.

Материал и методы

В период 2005–2006 гг. в областном центре термической травмы на базе городской клинической больницы №1 г. Читы обследовано 60 больных с отморожениями конечностей II-IV степеней.

Объектом исследования являлась кровь больных в возрасте от 17 до 50 лет. Средний возраст – 37 лет. Все пациенты были мужчины. У 35 больных наблюдалось поражение стоп, у 12 – кистей, у 13 – кистей и стоп.

Из исследования исключались лица с тяжелой соматической патологией (ИБС, гипертоническая болезнь, хронический алкоголизм, сахарный диабет). Распределение по группам проводилось в зависимости от периода клинического течения.

Первая группа – больные, поступившие в дореактивный период местной холодовой травмы – 11 человек.

Вторая – поступившие в раннем реактивном периоде, в первые двое суток после получения травмы – 20 больных.

Третья – в позднем реактивном периоде отморожений, то есть через 48 часов и более с момента поражения холодом – 34 пациента.

Все пациенты, у которых брали кровь для исследования, имели II-IV степени отморожений различной локализации. В последующем им проводилось хирургическое лечение в виде некрэктомии или остеонекрэктомии с аутодермопластикой или ампутации.

В ходе работы подсчитывались десквамированные эндотелиоциты методом Hladovec (1978). Метод основан на изоляции клеток вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью АДФ. С этой целью использовали свежую цитратную кровь.

Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали 10 мин при 1000 оборотах в минуту. Затем 1 мл плазмы смешивали с 0,2 мл натриевой соли АДФ в концентрации 1 мг/мл. Полученную смесь перемешивали в течение 10 минут, аккуратно встряхивая пробирки. Затем вновь центрифугировали в прежнем режиме для удаления агрегатов тромбоцитов. Свободный от тромбоцитов супернатант переносили в другую емкость и центрифугировали в прежнем режиме для удаления агрегатов тромбоцитов. Свободный от тромбоцитов поверхностный слой переносили в другую пробирку и центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 15 минут для осаждения эндотелиальных клеток, затем надосадочную плазму аккуратно удаляли, а полученный осадок суспензировали 0,1 мл 0,9% раствора и перемешивали стеклянной палочкой. Готовой суспензией заполняли камеру Горяева и подсчитывали в двух сетках методом контрастной микроскопии.

Статистический анализ проведен с помощью пакета программ Microsoft Excel с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что количество десквамированных эндотелиальных клеток у больных с отморожениями в дореактивном периоде травмы составило $9,4 \pm 0,7$ в 1 мкл ($p < 0,01$); в раннем реактивном – $21,2 \pm 1,6$ в 1 мкл ($p < 0,01$); в позднем реактивном – $4,9 \pm 0,8$ в 1 мкл ($p > 0,05$) (табл. 1).

При сравнении с нормальными значениями, установленными Hladovec, которые составляют 2-4 клеток в 1 мкл следует, что максимальное увеличение десквамированных клеток у больных определяется в раннем реактивном периоде. В эти сроки у них регистрируются значительные изменения в системах свертывания крови и фибринолиза. Отмечается укорочение АЧТВ, возрастание концентрации фибриногена, появление положительных реакций на этанол, увеличение времени развития эуглобулинового фибринолиза [2, 3]. По нашему мнению, наиболее весомую роль в формировании перечисленных нарушений играет повреждение эндотелия. В позднем реактивном периоде содержание десквамированных эндотелиальных клеток относительно раннего реактивного периода снижается в 4 раза. При этом сохраняются отклонения показателей систем свертывания крови и фибринолиза. Известно, что в данные сроки происходит ограничение воспалительного процесса в поврежденных тканях и в конце периода начинается эпителизация, а затем и рубцевание. При наличии участков глубокого поражения в позднем реактивном периоде выполняются некрэктомии, экзартикуляции и ампутации сегментов конечностей, то есть уже отсутствуют ткани с поврежденным эндотелием.

Возрастание количества циркулирующих в общем кровотоке эндотелиоцитов является след-

Таблица 1

Содержание эндотелиальных клеток в крови больных при местной холодовой травме ($M \pm m$)

Контроль	Периоды		
	Дореактивный, n=11	Ранний реактивный, n=20	Поздний реактивный, n=34
4 в 1 мкл	$9,4 \pm 0,7$ в 1 мкл $p < 0,01$	$21,2 \pm 1,6$ в 1 мкл $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$	$4,9 \pm 0,8$ в 1 мкл $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$

Примечание: p – достоверность относительно контроля; p_1 – достоверность относительно предыдущего периода.

Определение концентрации $TNF\alpha$ и IL-6 осуществляли с помощью наборов реагентов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Измерение их уровня проводили методом твердофазного ИФА в соответствии с инструкцией фирмы производителя.

ствием холодового повреждения эндотелия сосудов, что неизбежно должно привести к значительному возрастанию уровня провоспалительных цитокинов. Однако полученные значения $TNF\alpha$ и IL-6 неоднозначны (табл. 2).

Таблица 2

Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме (M±m)

Показатели, пкг/мл	Контроль, n=12	Периоды		
		Дореактивный, n=11	Ранний реактивный, n=20	Поздний реактивный, n=34
TNF α	9±4	14,7±2,9 p>0,05	44,0±4,6 p<0,01 p ₁ <0,01	26,6±3,4 p<0,05 p ₁ <0,01
IL-6	11±5	51,9±13,9 p<0,01	120,9±22,3 p<0,01 p ₁ <0,05	89,1±18,7 p<0,01 p ₁ >0,05

Примечание: p – достоверность относительно контроля; p₁ – достоверность относительно предыдущего периода.

Обращает на себя внимание относительно низкое (по сравнению с ожоговой и механической травмами) содержание TNF α в общем кровотоке у больных с отморожениями [3]. Причем в половине случаев в крови пациентов, обследованных в дореактивном периоде травмы, концентрация данного цитокина была ниже чувствительности тест-системы. В раннем реактивном периоде концентрация TNF α в крови возрастала выше контрольных значений – при развитии выраженной воспалительной реакции, наличии обширной зоны тканей с поврежденным эндотелием. В позднем реактивном периоде отморожений наблюдалось снижение концентрации TNF α (p₁<0,01), которая все же была выше контрольных значений (p<0,05). Уменьшение интенсивности воспалительной реакции соответствовало понижению уровня циркулирующих в крови эндотелиоцитов.

Не вызывает сомнений вклад поврежденного эндотелия в формирование острой фазы воспалительного процесса.

При исследовании содержания IL-6 в крови отмечено его увеличение во все периоды местной холодовой травмы. Повышение уровня данного цитокина в дореактивном периоде менее значительно. Наивысших значений IL-6 достигал в раннем реактивном периоде (p<0,01, p₁<0,05). В позднем – содержание данного цитокина снижалось, однако не достигало контрольных значений (p<0,01). Таким образом, отмечалась сходная динамика содержания IL-6 и TNF α в крови пациентов с отморожениями.

По всей видимости, относительно низкая концентрация исследованных цитокинов при местной холодовой травме в дореактивном периоде объясняется отключением пораженных тканей от общего кровотока, а также значительным повреждением эндотелия и выпадением его секреторной функции. Кроме того, часто системная реакция организма на воспаление при отморо-

жениях имеет компенсированный характер. Возможно, развитие острофазной воспалительной реакции при местной холодовой травме в меньшей степени, чем при других повреждениях, зависит от TNF α .

Заключение

Нами исследовалась концентрация цитокинов не только в общем, но и в регионарном кровотоках. У 12 больных с отморожениями нижних конечностей осуществлялся забор крови из бедренной и локтевой вен. Содержание цитокинов в регионарном кровотоке относительно общего было больше в дореактивном периоде в 4-20 раз, в раннем реактивном – в 2-10, в позднем – в 1,5-2.

Таким образом, пусковым механизмом в формировании нарушений систем микроциркуляторного гемостаза, развития воспалительной реакции при местной холодовой травме, по всей видимости, является повреждение клеток эндотелия сосудов.

Литература

1. Витковский, Ю.А. Роль цитокинов в регуляции системы гемостаза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Витковский Юрий Антонович; ГОУ ВПО «Читинская гос. мед. акад. Росздрава». – Чита, 1997. – 40 с.
2. Вихриев, Б.С. Местные поражения холодом / Б.С. Вихриев, С.Х. Кичемасов, Ю.Р. Скворцов. – Л.: Медицина, 1991. – 192 с.
3. Котельников, В.П. Отморожения / В.П. Котельников. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
4. Рыбдылов, Д.Д. Диагностика и лечение местной холодовой травмы / Д.Д. Рыбдылов // Мат. межобл. науч.-практ. конф. – Благовещенск, 2005. – С. 129 – 130.
5. Сизоненко, В.А. Клиническая оценка и лечение местной холодовой травмы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Сизоненко Владимир Александрович; Военно-медицинская академия. – Л., 1990. – 46 с.
6. Сизоненко, В.А. Биорегулирующая терапия при термической травме / В.А. Сизоненко, А.Р. Варфоломеев. – Чита, 1999. – 160 с.