

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

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

Городская клиническая больница № 1 (Чита)

*У больных с местной холодовой травмой в раннем реактивном периоде значительно возрастает содержание в кровотоке эндотелиальных клеток. Повреждение эндотелия приводит к некрозу тканей, воспалению и резкому увеличению в крови уровня провоспалительных цитокинов.*

**Ключевые слова:** отморожение, эндотелий, холодовая травма

## THE DAMAGE OF ENDOTHELIAL CELLS AND TRACK RECORD CYTOKINES AT PATIENTS IN DIFFERENT PERIODS OF LOCAL FROSTBITE

K.G. Shapovalov, E.A. Tomina, Y.A. Vitkovski, M.I. Mihailichenko, V.A. Sizonenko

Municipal Clinical Hospital N 1, Chita

*In patients with local frostbites in early reactive period well over in blood contents of endothelial cell. The damage of endothelium brings about necrosis, inflammation and growth in blood level of cytokines.*

**Key words:** frostbite, endothelial cell, thermal trauma

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

Прогнозирование распространенности и глубины поражения всегда являлось первостепенной задачей для определения дальнейшей тактики ведения пациентов и в конечном итоге решающим для его судьбы. 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, 5]. В механизмах развития патологии важное место отводится процессам альтерации эндотелия. Следствием чего могут являться нарушения в работе многих систем сосудистого и тканевого гомеостаза.

**Целью** нашего исследования явилось исследование содержания эндотелиальных клеток у больных в разные периоды местной холодовой травмы, а также изменение уровня TNF $\alpha$  и IL-6 в ответ на повреждение эндотелия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 40 больных с отморожениями II–IV степени конечностей. Все пациенты находились на стационарном лечении в областном цен-

тре термической травмы на базе городской клинической больницы № 1 в 2005–2006 гг.

Объектом исследования являлась кровь больных 17–50 лет. Средний возраст составил 37 лет. Все пациенты были мужского пола. В 25 случаях имело место поражение стоп, в 5 случаях – кистей, 8 больных имели поражение кистей и стоп.

Из исследования исключались лица, имеющие тяжелую соматическую патологию (ИБС, гипертоническую болезнь, хронический алкоголизм, сахарный диабет). Распределение по группам проводилось в зависимости от периода клинического течения

Первую группу составили 8 больных, поступивших в дореактивный период местной холодовой травмы.

Во вторую группу вошли 10 пациентов в раннем реактивном периоде, в первые двое суток после получения травмы.

Третью группу составили 22 пострадавших в позднем реактивном периоде отморожений, то есть через 48 часов и более с момента поражения холодом.

Все пациенты, у которых брали кровь для исследования, имели II–IV степень отморожений различной локализации. Им проводилось в последующем хирургическое лечение в виде некрэктомий или остеонекрэктомий 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.

Кровь забирали из локтевой вены в количестве 5 мл, добавляли стабилизатор 3,8% цитрат натрия в соотношении 1:9.

Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали 10 мин при 1000 об./мин. Затем 1 мл плазмы смешивали с 0,2 мл натриевой соли АДФ в концентрации 1 мг/мл. Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин, аккуратно встряхивая пробирки. Далее 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.

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

Математический анализ проведен методом вариационной статистики с определением различий по критерию Стьюдента. Обработка параметров выполнена программным пакетом «Биостат».

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Динамика концентрации эндотелиальных клеток представлены в таблице 1.

Количество десквамированных эндотелиальных клеток у больных в дореактивный период составило  $9,4 \pm 0,7$ /мкл. В ранний реактивный период  $21,2 \pm 1,6$ /мкл, в поздний реактивный период  $4,9 \pm 0,8$ /мкл. При сравнении с нормальными значениями, установленными Hladovec, которые составляют 2 – 4 клеток в 1 мкл, следует, что максимальное увеличение десквамированных клеток определяется в ранний реактивный период. В эти

сроки у больных с местной холодовой травмой регистрируются значительные изменения в системах свертывания крови и фибринолиза. Отмечается укорочение АЧТВ, возрастание концентрации фибриногена, появление положительных реакций на этанол, увеличение времени развития зуглобулинового фибринолиза. По нашему мнению, наиболее весомую роль в формировании перечисленных нарушений играет повреждение эндотелия. В поздний реактивный период содержание десквамированных эндотелиальных клеток относительно дореактивного и раннего реактивного периодов снижается в 4 раза, однако остается выше контроля. В данный период сохраняются отклонения показателей систем свертывания крови и фибринолиза, а также регистрируется увеличение содержания провоспалительных цитокинов и положительных белков острой фазы воспаления. Не вызывает сомнений вклад поврежденного эндотелия в формирование острой фазы воспалительного процесса. Известно, что в данные сроки формируется отграничение 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 следствием 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).

Обращает на себя внимание относительно низкое (по сравнению с ожоговой и механической травмой) содержание TNF $\alpha$  в общем кровотоке у больных с отморожениями. Причем в половине случаев в крови пациентов, находящихся в дореактивном периоде, концентрация данного цитоки-

**Таблица 1**  
Содержание эндотелиальных клеток в крови больных при местной холодовой травме

Контроль	Дореактивный период (n = 8)	Ранний реактивный период (n = 10)	Поздний реактивный период, (n = 22)
4/мкл	$9,4 \pm 0,7$ /мкл $p < 0,01$	$21,2 \pm 1,6$ /мкл $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$	$4,9 \pm 0,8$ /мкл $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$

Примечание: p – достоверность относительно контроля; p<sub>1</sub> – достоверность относительно дореактивного периода.

**Таблица 2**  
Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме

Показатели, пкг/мл	Контроль	Дореактивный период	Ранний реактивный период	Поздний реактивный период
TNF $\alpha$	$13 \pm 4$	$14,7 \pm 2,9$ $p > 0,05$	$44,0 \pm 4,6$ $p < 0,01$	$26,6 \pm 3,4$ $p < 0,05$
IL-6	$11 \pm 5$	$51,9 \pm 13,9$ $p < 0,01$	$120,9 \pm 26,3$ $p < 0,01$	$89,1 \pm 18,7$ $p < 0,01$

Примечание: p – достоверность относительно контроля.

на была ниже чувствительности тест-системы. В раннем и позднем реактивном периоде концентрация TNF $\alpha$  в крови возрастала выше контрольных значений — при развитии выраженной воспалительной реакции, осложненном течении раневого процесса.

При исследовании содержания IL-6 в крови отмечено превышение контрольных значений во все периоды местной холодовой травмы. Повышение уровня данного цитокина в дореактивном периоде менее значительно.

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 отморожениях имеет компенсированный характер. Известно также, что продукция TNF $\alpha$  ингибируется IL-6. Возможно, развитие острофазной воспалительной реакции при местной холодовой травме в меньшей степени, чем при других повреждениях, зависит от TNF $\alpha$ .

Нами исследовалась концентрация цитокинов не только в общем, но и в регионарном кровотоке. У 12 больных с отморожениями нижних конечностей осуществлялся забор крови из бедренной и локтевой вен. Содержание цитокинов в регионар-

ном кровотоке относительно общего было больше в дореактивном периоде в 4 — 20 раз, в раннем реактивном периоде — в 2 — 10 раз, в позднем реактивном периоде — в 1,5 — 2 раза.

#### ВЫВОДЫ

Таким образом, пусковым механизмом в формировании нарушений систем гемостаза, фибринолиза, 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. ... докт. мед. наук. — Чита, 1997.
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.
5. Сизоненко В.А. Биорегулирующая терапия при термической травме / В.А. Сизоненко, А.Р. Варфоломеев. — Чита, 1999. — 160 с.
6. Сизоненко В.А. Клиническая оценка и лечение местной холодовой травмы: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Л., 1990.