

Коннов В.А., Шаповалов К.Г.

Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с местной холодовой травмой при различном нутритивном статусе

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, г.Чита, ул. Горького 39-А

Цель исследования — установление относительного числа и степени лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных с отморожениями конечностей III—IV степени при недостаточности питания и эйтрофии. **Методика.** Проведено нерандомизированное проспективное контролируемое обследование 49 пациентов обоего пола, возрастом от 16 до 60 лет, с отморожениями конечностей III—IV степени. Объектом исследования являлась плазма крови. Пациенты были разделены на 2 группы по состоянию исходного трофического статуса согласно шкале Луфта В.М. и Костюченко А.Л. По оригинальной методике профессора Ю.А. Витковского (1999) подсчитывалось количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов на 100 клеток (в процентах), что является относительным числом лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА). При этом за коаграт принимался лимфоцит, адгезировавший на своей поверхности один или более тромбоцитов. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ), или степень ЛТА оценивали, как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту. **Результаты.** В группе больных с эйтрофией (n = 19) выявлено статистически значимое увеличение относительного числа ЛТА против группы контроля (n = 20) и против группы пациентов с нутритивной недостаточностью (n = 20). Значимых различий в относительном числе ЛТА в группе с недостаточностью питания по сравнению с группой контроля не выявлено. В группе пострадавших с нормальным трофическим статусом установлено статистически значимое увеличение степени ЛТА против группы контроля и группы пациентов с недостаточностью питания. Выявлено значимое увеличение ЛТИ в группе с трофической недостаточностью в сравнении с группой контроля. **Заключение.** Таким образом, у пациентов с глубокими отморожениями конечностей ЛТИ возрастает независимо от преморбидного трофического статуса, а относительное число ЛТА увеличивается только у пострадавших с эйтрофией. У них же степень и процент ЛТА выше, чем у больных с мальнутрицией.

Ключевые слова: отморожение, местная холодовая травма, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия, недостаточность питания

Для корреспонденции: Коннов Валерий Анатольевич, ассистент каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии, e-mail: vlrknv@mail.ru

Для цитирования: Коннов В.А., Шаповалов К.Г. Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с местной холодовой травмой при различном нутритивном статусе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60 (3): 52—56.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 28.01.15

Konnov V.A., Shapovalov K.G.

Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses

Chita State Medical Academy, 39A, Gorky Street, Chita, 672000, Russia

The purpose of the study was to determine the relative number and degree of lymphocyte-platelet adhesion in patients with frostbites of III—IV degree of extremities with malnutrition and eutrophia. **Methods.** Non-randomized prospective controlled study was performed in 49 patients of both sexes, aged from 16 to 60 years, with frostbites of III—IV degree of extremities. The object of the study was the blood plasma. Test subjects were divided into two groups according to the trophic status on the scale of Luft V.M and Kostyuchenko A.L. By the original method of the Professor Vitkovsky Yu.A. (1999) number of lymphocyte-platelet coaggregations was counted in 100 cells (percentage), which is relative number of the lymphocyte-platelet adhesion (LTA). In this case lymphocyte which adhered to its surface one or more platelets was named the coaggregation. Lymphocyte-platelet index (LTI) or the degree of LTA was determined as the arithmetic mean of the

number of platelets which have adhered to a single lymphocyte. **Results.** The relative number of LTA greater in patients with eutrophia ($n = 19$) vs. ($p < 0.001$) the control group ($n = 20$) and vs. ($p = 0.008$) patients with malnutrition ($n = 20$). The relative number of LTA is not different in patients with malnutrition vs. ($p = 0.085$) the control group. LTI greater in patients with eutrophia vs. the control group ($p < 0.001$), and vs. patients with malnutrition ($p = 0.020$). LTI greater in patients with malnutrition vs. the control group ($p = 0.006$). **Conclusion.** It was established that LTI increased irrespective of premorbid trophic status, and LTA percentage increased only in patients with eutrophia. In patients with malnutrition LTA degree and LTA percentage were detected less than in patients with normal nutritional status.

Keywords: frostbite; local cold injury; lymphocyte-to-platelet adherence; lymphocyte-platelet adhesion; malnutrition

For citation: Konnov V.A., Shapovalov K.G. Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 52–56. (in Russ).

For correspondence: Valeriy A. Konnov, Chita State Medical Academy; 39A, Gorky Street, Chita, 672000, Russia, e-mail: vlrknv@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Konnov V.A. — <http://orcid.org/0000-0003-3540-178X>

Shapovalov K.G. — <http://orcid.org/0000-0002-3485-5176>

Received 28.01.15

Введение

Реализация механизмов защиты при криповреждении сосудистой стенки сопровождается повышением адгезивной активности кровяных пластинок к лимфоцитам. Увеличение интенсивности образования лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов прямо пропорционально массиву поврежденных холодом тканей [1]. Одновременно, под действием низких температур возникает спазм и парез сосудов с повреждением эндотелия, альтерацией клеток, обнажением коллагена. Число десквамированных эндотелиоцитов в раннем реактивном периоде местной холодной травмы увеличивается на порядок [2].

Между гемостатическими и воспалительными реакциями при альтерации ткани прослеживаются многочисленные взаимосвязи, в которых ключевым звеном выступают реципрокные отношения полиморфноядерных лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток [3]. Тромбоциты интенсифицируют фагоцитоз через высвобождаемые факторы и за счёт своей ретракции способствуют миграции лимфоцитов через повреждённую сосудистую стенку вглубь ткани [4]. Кровяные пластинки при этом инкретируют множество ростовых факторов, стимулирующих репарацию поражённого участка [4]. В результате развивается тромбоз сосудов и нарушения микроциркуляции, способствующие отграничению очага поражения и запуску саногенных механизмов [3].

У больных с отморожениями конечностей III—IV степени и преморбидной недостаточностью питания количество тромбоцитов в раннем реактивном периоде меньше, чем у пострадавших с эйтро-

фией. В то же время, в позднем реактивном периоде содержание кровяных пластинок у пациентов с различным нутритивным статусом не отличается [5]. При этом неизвестно влияние трофического дефицита на интенсивность лимфоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий у больных с местной холодной травмой.

Цель исследования: установить относительное число и степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных с отморожениями конечностей III—IV степени при недостаточности питания и эйтрофии.

Методика

Нерандомизированное проспективное контролируемое исследование выполнено в «Лаборатории физиологии и патологии иммунитета и гемостаза» НИИ медицинской экологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» (ЧГМА) 49 пациентам обоего пола с местной холодной травмой, поступивших в ГУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Читы в 2009—2012 гг. Объектом исследования являлась плазма крови. Работа признана допустимой и рекомендованной к выполнению локальным этическим комитетом при ГБОУ ВПО ЧГМА от 26.11.2010 г.

Возраст пострадавших составлял от 16 до 60 лет. Критерии включения в исследование: отморожение III—IV степени конечностей; госпитализация в дореактивный, ранний и поздний реактивные периоды; форма отморожения от действия сухого мороза, контактные отморожения, возникающие при субкритиче-

ской температуре тканей, форма отморожения по типу траншейной и иммерсионной стопы. Диагноз устанавливался на основании жалоб, анамнеза и локального статуса. Верификация глубокого отморожения не исключала наличия участков поверхностного поражения I—II степени. У всех больных в состав терапии с момента поступления согласно протоколу ведения входили антикоагулянты прямого действия в профилактической дозе.

Критерии исключения из исследования: возраст моложе 16 лет и старше 60 лет, хронический вид местной холодовой травмы, сепсис, печёночная дисфункция. Печёночная недостаточность различной этиологии сопровождается нарушениями регуляции синтеза белков и, сама по себе, является причиной трофического дефицита. При сепсисе синдром гиперметаболизма-гиперкатаболизма является инклюзивным патогенетическим звеном [6] и приводит к госпитальной белково-энергетической недостаточности [7]. Тяжёлый сепсис характеризуется системным повреждением эндотелия [3], и оценка лимфоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий становится некорректной.

Пациенты разделялись на 2 группы по состоянию исходного трофического статуса. Оценка питания проводилась при поступлении по сумме баллов по шкале Луфта В.М. и Костюченко А.Л. [8]. В 1-ю группу вошли 20 пострадавших с недостаточностью питания, сумма баллов у которых не превышала 27 баллов. Группу 2-ю составили 19 больных с эйтрофией (28—30 баллов). Контрольная группа включала 20 здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту.

Относительное число лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) в процентах и степень ЛТА, или лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ) рассчитывались по оригинальной методике профессора Ю.А. Витковского [9]. Забор крови испытуемого проводился из вены предплечья или локтевого сгиба без применения турникетной компрессии объёмом 5,0 мл в пробирку Monovette производства Sarstedt AG (Germany), содержащую 3,2% раствор цитрата натрия. Забор крови осуществлялся с 08-00 до 09-00 ч (до приёма пищи).

Для получения общего пула лимфоцитов кровь наслаивалась на градиент урографин-фикол с плотностью 1,077 и центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 40 мин. Седиментированное интерфазное кольцо, содержащее лимфоциты и кровяные пластинки снималось пастеровской пипеткой (дозатором). Полученная клеточная взвесь промывалась фосфатно-солевым буфером pH 7,4 и центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 4 мин. Надосадочная жидкость сливалась. Осадок ресу-

спендировали и микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток (в процентах), что является относительным числом ЛТА. При этом за коагрегат принимался лимфоцит, адгезировавший на своей поверхности 1 или более тромбоцитов. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (или степень ЛТА) оценивался, как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту.

Результаты исследования обработаны с помощью программ Biostat 2009 Professional 5.8.4 и Microsoft Excel 2007. При сравнении групп использовался критерий Манна—Уитни с указанием точного значения статистической значимости (p). Данные представлены доверительным интервалом.

Результаты и обсуждение

В группе больных с эйтрофией ($n = 19$) выявлено статистически значимое увеличение (рис. 1) относительного числа ЛТА против группы контроля ($n = 20$) и группы пациентов с нутритивной недостаточностью ($n = 20$). Наряду с этим, не было выявлено статистически значимых различий в относительном числе ЛТА в группе с недостаточностью питания в сравнении с относительным числом ЛТА группы контроля (рис. 1).

В группе пострадавших с нормальным трофическим статусом установлено значимое увеличение степени ЛТА (рис. 2) против группы сравнения и группы пациентов с недостаточностью питания. Выявлено существенное увеличение ЛТИ в группе с трофической недостаточностью в сравнении с группой контроля (рис. 2).

Таким образом, у больных с местной холодовой травмой лишь при отсутствии трофической недостаточности возрастает относительное количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов. Вместе с тем, степень ЛТА остаётся увеличенной в сравнении со здоровыми людьми как у пациентов с эйтрофией, так и при недостаточности питания. Несмотря на это, ЛТИ, а, следовательно, и интенсивность лимфоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий выше при нормальном трофическом статусе и большем количестве тромбоцитов [5] в раннем реактивном периоде.

Известно, что дисцитокинемия модулирует феномен ЛТА у различных групп пациентов [10—13]. В нашем случае преморбидная трофическая недостаточность не триггирована гиперкатаболизмом, как частью генерализованного воспалительного ответа, следовательно, отсутствует системное влияние медиаторов воспаления. Этим возможно объяснить незначи-

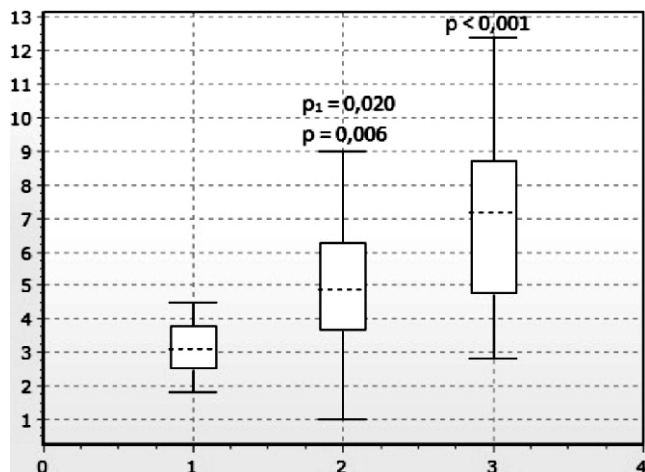


Рис. 1. Относительное число ЛТА (%) в крови пациентов с эйтрофией и недостаточностью питания при отморожении конечностей III–IV степени (минимальное значение, 25-й процентиль, медиана, 75-й процентиль и максимальное значение). 1 – группа контроля (n = 20); 2 – группа № 1 (пациенты с недостаточностью питания, n = 20); 3 – группа № 2 (пациенты с эйтрофией, n = 19); p – статистическая значимость различий с контролем; p₁ – статистическая значимость различий между группами № 1 и № 2.

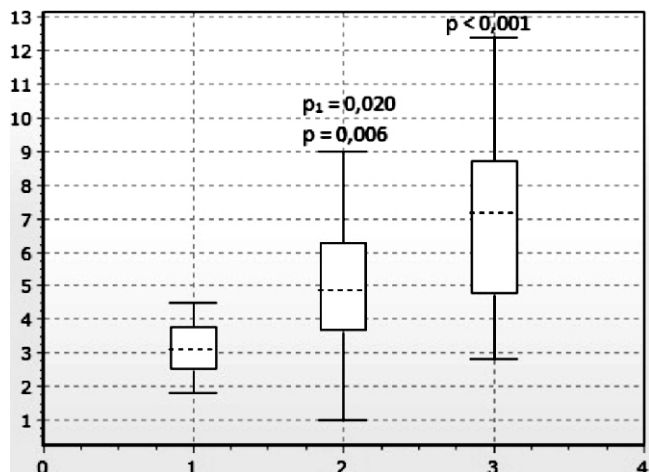


Рис. 2. Степень ЛТА в крови пациентов с эйтрофией и недостаточностью питания при отморожении конечностей III–IV степени (минимальное значение, 25-й процентиль, медиана, 75-й процентиль и максимальное значение). 1 – группа контроля (n = 20); 2 – группа № 1 (пациенты с недостаточностью питания, n = 20); 3 – группа № 2 (пациенты с эйтрофией, n = 19); p – статистическая значимость различий с контролем; p₁ – статистическая значимость различий между группами № 1 и № 2.

тельный рост относительного числа и меньшую степень ЛТА у пострадавших с мальнутрицией.

В то время, у больных стенокардией, получающих антикоагулянтную терапию по традиционной схеме, в циркулирующей крови снижается относительное число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, вероятно, за счёт повышенного перемещения активированных лимфоцитов и кровяных пластинок через сосудистую стенку [14]. Вместе с тем, при назначении таким пациентам небольших доз аспирина, ингибирующих тромбоцитарную циклооксигеназу, уменьшается синтез тромбоксана A₂ (ТХА₂), агрегационное действие которого проявляется при повреждённой сосудистой стенке [3]. В результате снижается контакт коагрегатов с эндотелием, и процент ЛТА в плазме не отличается от нормальных показателей [14].

Согласно нашим наблюдениям, недостаточность питания у пациентов с местной холодовой травмой III–IV степени детектируется увеличением содержания в крови одного из птеридинов — неоптерина [15]. Известно, что модуляция неоптерином внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса активирует транслокацию транскрипционного фактора NF-κB внутрь клеточного ядра с последующей экспрессией протромботических медиаторов [16].

Возможно экстраполировать преобладание циклооксигеназного пути в тромбоцитах с последующей гиперагрегацией у больных со стенокардией, не получающих небольшие дозы аспирина, на генерацию

ТХА₂, основного эффектора агрегации кровяных пластинок, индуцированного неоптерином у истощённых больных с глубоким отморожением. В обоих случаях имеет место повреждение сосудистой стенки, значительный контакт лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов с коллагеном, повышенная миграция их в ткани, и, следовательно, уменьшение относительного числа ЛТА в циркулирующей крови.

Выводы

1. В крови больных с глубоким отморожением конечностей увеличивается степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии независимо от преморбидного нутритивного статуса.
2. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс в плазме пациентов с местной холодовой травмой III–IV степени при мальнутриции меньше, чем у пострадавших с эйтрофией.
3. У больных с глубоким отморожением конечностей относительное число лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии возрастает в крови только при нормальном трофическом статусе.

References

1. Shapovalov K.G., Tomina E.A., Mikhailichenko M.I., Vitkovsky Yu.A. The role of lymphocyte-platelet adhesions, cytokines and endothelial dysfunction in pathogenesis of cold-induced damage. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2009; 1: 39-40. (in Russian)

2. Shapovalov K.G., Tomina E.A., Mikhailichenko M.I., Sizonenko V.A., Vitkovsky Yu.A. Damage of endothelial cells and cytokine levels in the blood of patients at different periods of local cold injury. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2008;1: 35-7. (in Russian)
3. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostatic system in health and disease. [*Kletochnyye i molekulyarnyye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii*]. Chita; 2010. (in Russian)
4. Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.N. Pathogenetic significance of lymphocyte-to-platelet adherence. *Medit-sinskaya immunologiya*. 2006; 8(5-6): 745-53. (in Russian)
5. Konnov V.A., Shapovalov K.G. Parameters of vascular-platelet hemostasis and plasma-coagulation hemostasis. *Skoraya meditsinskaya pomoshch'*. 2011; 3: 34-8. (in Russian)
6. Modern conception of nutritional support in critically ill. 5 key issues. *Intensivnaya terapiya*. 2005; 1. Available at: <http://icj.ru/journal/number-1-2005/14-sovremennaya-koncepciya-nutritivnoy-podderzhki-pri-kriticheskikh-sostoyaniyah-5-klyuchevyh-problem.html> (Accessed June 9, 2014). (in Russian)
7. Luft V.M., Bagnenko S.F., Shcherbin Yu.A., eds. Clinical nutrition patients in intensive care: Practical Guide. [*Klinicheskoe pitanie bol'nykh v intensivnoy meditsine: prakticheskoe rukovodstvo*]. Saint Petersburg; 2010. (in Russian)
8. Parenteral nutrition in intensive care and surgery: guidelines of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation on August 29, 2006 № 4630. [Parenteral'noe pitanie v intensivnoy terapii i khirurgii: metodicheskie rekomendatsii Ministerstvava zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya Rossiyskoy Federatsii ot 29 avgusta 2006 g. № 4630]. Moscow; 2006. (in Russian)
9. Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.N. Phenomenon of lymphocyte-thrombocyte rosette formation. *Immunologiya*. 1999; 4: 35-7. (in Russian)
10. Gergesova E.E., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.N. Platelet aggregation, lymphocyte-platelet adhesion in different AB0 blood groups in patients with influenza A (H1N1) / 2009. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2011; 1: 4-9. (in Russian)
11. Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Lymphocyte-platelet adhesion and pro-inflammatory cytokines contents in patients with erysipelas. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 27(1): 57-9. (in Russian)
12. Epifanceva N.V., Vitkovsky Yu.A. The link between lymphocyte-platelet adhesion and cytokines in children with pertussis infection. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2011; 2: 98-103. (in Russian)
13. Knyazeva A.S., Strambovskaia N.N. Aggregation activity of platelets and formation of lymphocyte-platelet aggregates at carriers of cytokine genetic polymorphism of patients with chronic ischemia of brain. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2014; 1: 32-38. (in Russian)
14. Romanyuk S.V., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.N. Lymphocyte-platelet adhesion in patients with angina and acute coronary syndrome. *Sovremennyye nauchnyye issledovaniya i innovatsii*. 2012; 11. Available at: <http://web.snauka.ru/issues/2012/11/18607> (Accessed June 9, 2014). (in Russian)
15. Konnov V.A., Shapovalov K.G. The level of mediators of the immune response in blood of patients with local cold injury and premorbid malnutrition. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2014; 11(5): 34-9. (in Russian)
16. Pacileo M., Cirillo P., De Rosa S., Ucci G., Pettilo G., Musto D'Amore S. *et al.* The role of neopterin in cardiovascular disease. *Monaldi Arch. Chest Dis*. 2007; 2(68): 68-73.

Сведения об авторах:

Шаповалов Константин Геннадьевич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии