

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ, ЛИМФОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНАЯ АДГЕЗИЯ И ЭКСПРЕССИЯ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА У БОЛЬНЫХ РОЖИСТЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ**Альвина Николаевна ЕМЕЛЬЯНОВА, Юрий Антонович ВИТКОВСКИЙ***ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Росздрава
672090, г. Чита, ул. Горького, 39а*

У больных с эритематозной и эритематозно-буллезной формой рожистого воспаления изучено содержание провоспалительных цитокинов, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия и экспрессия тканевого фактора лейкоцитами периферической крови. Установлено, что у пациентов существенно повышается продукция провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ФНО α и хемокина ИЛ-8. При рожистом воспалении снижается способность лимфоцитов адгезировать на своей поверхности тромбоциты. Показатель и степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии является более выразительными свидетелями функции иммунокомпетентных клеток при рожистом воспалении по сравнению с изменением числа лимфоцитов. У больных с эритематозно-буллезной формой рожистого воспаления наблюдаются большие сдвиги параметров лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, чем у пациентов с эритематозной формой. При рожистом воспалении увеличивается экспрессия тканевого фактора моноцитами периферической крови, обуславливая развитие гиперкоагуляции.

Ключевые слова: рожистое воспаление, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия, провоспалительные цитокины, тканевой фактор.

В наше время заболеваемость рожистым воспалением остается высокой без тенденции к снижению, занимая существенное место в структуре временной утраты трудоспособности, вплоть до инвалидизации, снижая качество жизни. При этом учащается переход острых форм в хронические; изменяется клиническое течение в сторону утяжеления инфекции и развития осложнений [1, 2]. К настоящему времени до конца не изучен патогенез рожистого воспаления, в котором иммунологические и гемостазиологические звенья являются ведущими и определяют характер течения заболевания. Известно, что между иммунитетом и гемостазом существуют тесные взаимосвязи, включающие клеточные и гуморальные реакции [3]. Их более глубокое изучение может пролить свет на механизмы развития рожистого воспаления.

Целью настоящей работы явилось исследование продукции провоспалительных цитокинов, лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и экспрессии тканевого фактора лейкоцитами периферической крови у больных с рожистым воспалением.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 20 больных (10 женщин и 10 мужчин) с эритематозно-буллезной формой средней степени и 30 больных (12 мужчин и 18 женщин) с эритематозной формой средней степени рожистого воспаления в возрасте 45–55 лет. У всех больных диагностировано первичное заболевание

с локализацией воспалительного процесса на нижних конечностях. Больные госпитализированы в течение 1–3 суток с начала клинических проявлений болезни.

У всех пациентов лабораторные исследования проводились на 3 сутки с момента проявления симптомов рожистого воспаления до получения лекарственной терапии.

Контрольная группа представлена 55 здоровыми лицами обоего пола в возрасте 45–55 лет.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации (2000 г.).

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа реактивами ООО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Определение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) осуществляли по методу Ю.А. Витковского и соавт. [4]. Свежую гепаринизированную кровь обследуемых больных насаивали на градиент урографин-фиколл (плотность 1,077) и выделяли лимфоциты как описано выше. Собирали интерфазное кольцо, содержащие клетки и кровяные пластинки, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3–4 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов

на 100 клеток. Степень адгезии определяли как число кровяных пластинок, адгезированных на поверхности одного лимфоцита.

Исследование экспрессии тканевого фактора лейкоцитами осуществляли по методу, предложенному R.A. Santucci et al. [5], в нашей модификации. Забор крови у каждого больного производился в две вакуумные силиконизированные пробирки, содержащие 0,5 мл 3,8% раствора цитрата натрия, в количестве 4,5 мл. В одну из пробирок вносили продигозан в дозе 10 мкг/мл крови, во вторую — 10 мкл физиологического раствора. Пробирки инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 4 часов. После инкубации кровь перемешивали и использовали для исследования экспрессии тканевого фактора. Для этого цельную цитратную кровь в количестве 0,1 мл вносили в полистироловую кювету, добавляли 0,1 мл забуференного физиологического раствора (рН 7,4) и запускали реакцию добавлением 0,2 мл 1/40 М раствора хлорида кальция. Время свертывания крови регистрировали импедансным методом с помощью коагулографа.

Для оценки экспрессии тканевого фактора моноцитами сравнивали время свертывания образцов крови с добавлением продигозана и без него. Об экспрессии тканевого фактора судили по степени сокращения времени коагуляции, выражаемой в процентах по формуле:

$$\frac{(T_1 - T_2) \times 100\%}{T_1}$$

где T_1 — время свертывания нестимулированной крови, T_2 — время свертывания стимулированной крови.

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с помощью программы «Microsoft Excel», достоверность различий определяли с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что концентрация провоспалительных цитокинов резко увеличивается у больных с обеими формами рожистого воспаления. Так, у пациентов с эритематозно-буллезной формой она повышалась для ИЛ-1 α до $163,8 \pm 10,2$ пг/мл, для ИЛ-1 β — до $221,0 \pm 18,2$ пг/мл, в то время как у здоровых составляла $19,3 \pm 4,1$ и $32,6 \pm 9,4$ пг/мл соответственно ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом одновременно выявлялся подъем содержания ФНО α до $321,6 \pm 21,6$ пг/мл против $12,3 \pm 2,1$ пг/мл в контроле ($p < 0,001$), нарастала продукция хемокина ИЛ-8 с $25,9 \pm 4,2$ до $282,3 \pm 19,7$ пг/мл ($p < 0,001$). При эритематозной форме у больных также выявлялись высокие значения концентраций провоспалительных цитокинов (табл. 1).

У пациентов с рожистым воспалением мы не обнаружили существенных изменений в содержании абсолютного числа лимфоцитов в начале заболевания по сравнению со здоровыми людьми (табл. 2). Однако показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии

Таблица 1

Содержание цитокинов у больных рожистым воспалением, пг/мл ($M \pm m$)

Цитокины	Здоровые люди (n = 55)	Больные с рожистым воспалением	
		эритематозно-буллезная форма (n = 20)	эритематозная форма (n = 30)
ИЛ-1 α	$19,3 \pm 4,1$	$163,8 \pm 10,2$ *	$153,6 \pm 12,3$ *
ИЛ-1 β	$32,6 \pm 9,4$	$221,0 \pm 18,2$ *	$186,9 \pm 14,2$ *
ИЛ-8	$25,9 \pm 4,2$	$321,6 \pm 21,6$ *	$283,5 \pm 16,8$ *
ФНО α	$12,3 \pm 2,1$	$282,3 \pm 19,7$ *	$231,5 \pm 16,5$ *

Примечание: здесь и в таблицах 2, 3: * — отличие от соответствующего показателя у здоровых лиц достоверно ($p < 0,001$).

Таблица 2

Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных рожистым воспалением ($M \pm m$)

Наблюдаемые группы	Лимфоциты, абс. $\times 10^9$ /л	Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия		Степень адгезии
		отн., %	абс. $\times 10^9$ /л	
Здоровые (n = 55)	$2,04 \pm 0,4$	$14,0 \pm 1,0$	$0,69 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,1$
Больные рожистым воспалением:				
эритематозно-буллезная форма (n = 20)	$1,95 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,3$ *	$0,10 \pm 0,02$ *	$1,2 \pm 0,05$ *
эритематозная форма (n = 30)	$1,89 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,3$ *	$0,16 \pm 0,03$ *	$1,3 \pm 0,06$ *

уже в эти сроки резко снижался. Так, у больных с эритематозно-буллезной формой он уменьшался до $2,0 \pm 0,3\%$, эритематозной — до $3,0 \pm 0,3\%$, тогда как у здоровых составлял $14,0 \pm 1,0\%$ ($p < 0,001$). Соответственно этому изменялось абсолютное число лимфоцитов, присоединивших к себе кровяные пластинки: у больных — $(0,10 \pm 0,02) \times 10^9/\text{л}$ и $(0,16 \pm 0,03) \times 10^9/\text{л}$, а у здоровых — $(0,69 \pm 0,02) \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,001$).

Одновременно с этим уменьшалось среднее число тромбоцитов, адгезированных на поверхности лимфоцита (степень адгезии) — с $3,2 \pm 0,1$ в контроле до $1,2 \pm 0,05$ при эритематозно-буллезной форме и до $1,3 \pm 0,06$ при эритематозной форме заболевания ($p < 0,001$).

Известно, что между иммунитетом и гемостазом существуют тесные взаимосвязи и цитокины являются сигнальными молекулами, определяющими течение не только иммунных, но и гемостазиологических реакций [3]. В связи с этим мы исследовали экспрессию тканевого фактора моноцитами периферической крови, поскольку он является основным триггером гиперкоагуляции и индуцируется главным образом провоспалительными цитокинами. С этой целью нами проводилась оценка времени коагуляции рекальцифицированной цельной крови после 4-часовой инкубации в присутствии продигозана. В качестве контроля служила нестимулированная культура крови. По разности времени коагуляции стимулированной и нестимулированной крови судили о степени экспрессии тканевого фактора.

Как показали наши исследования, у здоровых людей отмечается выраженная разница между стимулированными продигозаном и нестимулированными образцами крови, составляющая $45,0 \pm 2,5\%$ (табл. 3). Однако у пациентов с эритематозной формой рожистого воспаления эта разница уменьшилась до $18,5 \pm 2,8\%$ ($p < 0,001$), а с эритематозно-буллезной — до $10,3 \pm 3,1\%$, что указывает на высокую экспрессию тканевого фактора.

Как можно объяснить полученные результаты? Мы считаем, что инициация сдвигов при рожистом воспалении начинается с продукции провоспалительных цитокинов и, в частности, ИЛ-1 β . Параллельно у больных с рожистым воспалением возрастает продукция ФНО α . Одновременно происходит подъем концентрации хемокина ИЛ-8, вероятно, связанный с тем, что ИЛ-1 β является внутриклеточным индуктором биосинтеза его мРНК. Все изучаемые провоспалительные цитокины оказывают индуцирующее влияние на экспрессию тканевого фактора моноцитами периферической крови, а в сосудистом русле — и эндотелиальными клетками [6]. Тканевой фактор — главный физиологический инициатор гемокоагуляции. Он представляет собой трансмембранный гликопротеин, который одновременно является поверхностным клеточным рецептором и кофактором плазменного фактора свертывания VII. Активация проферментно-ферментного каскада свертывания крови с участием тканевого фактора приводит к образованию тромбина, активации тромбоцитов, отложению фибрина при рожистом воспалении.

В настоящее время широко изучаются межклеточные взаимодействия, в основе которых лежат механизмы сигнализации, опосредуемые цитокинами. Известно, что непосредственная адгезия играет существенную роль во взаимодействии между тромбоцитами и нейтрофилами. Установлено, что адгезивные взаимодействия между тромбоцитами и лейкоцитами являются важными звеньями механизмов, обеспечивающих миграцию лейкоцитов в зону повреждения, а, следовательно, воспаления и развития там иммунных и репаративных реакций [7].

Как установлено Ю.А. Витковским и соавт., лимфоциты образуют коагрегаты с тромбоцитами. Т-хелперы (CD4+) способны к спонтанному розеткообразованию с интактными тромбоцитами. Интерлейкин-2 и ИЛ-1 β повышают розет-

Таблица 3

Время коагуляции неактивированной и активированной продигозаном крови больных рожистым воспалением ($M \pm m$)

Наблюдаемые группы	Время коагуляции крови		Сокращение времени коагуляции, %
	неактивированной, с	активированной ЛПС, с	
Здоровые (n = 45)	$171,6 \pm 17,9$	$94,8 \pm 2,3$	$45,0 \pm 2,5$
Больные рожистым воспалением:			
Эритематозная форма (n = 20)	$116,2 \pm 11,3^*$	$94,5 \pm 4,1$	$18,5 \pm 2,8^*$
эритематозно-буллезная форма (n = 30)	$103,6 \pm 18,2^*$	$92,5 \pm 6,2$	$10,3 \pm 3,1^*$

кообразующую способность хелперно-индуцирующих клеток с интактными тромбоцитами и индуцирует ее у натуральных киллеров (CD16+) [4, 8, 9].

Тромбоциты стимулируют адгезию лимфоцитов к экстрацеллюлярному матриксу в условиях тока жидкости, но не в статическом состоянии. При этом лимфоцитарно-тромбоцитарные кластеры, сформированные на поверхности экстрацеллюлярного матрикса, являются главными триггерами адгезии лимфоцитов. Механизм лимфоцитарно-тромбоцитарного взаимодействия включает в себя образование интегриновых и неинтегриновых мостов, таких как α_{IIb}/β_3 - и β_1 -связанные интегрины, Р-селектин-PSGL и CD40-CD40L. Установлено, что интерлейкины 2 и 16 повышают число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на поверхности экстрацеллюлярного матрикса в условиях тока жидкости [10–12].

Снижение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при рожистом воспалении на фоне высокой концентрации провоспалительных цитокинов можно рассматривать как результат усиленной миграции лимфоцитов в очаг повреждения. Сами кровяные пластинки, усиливая свой контакт с лимфоцитами, главным образом Т-хелперами, способны стимулировать их посредством высвобождающихся из тромбоцитов молекул ИЛ-1. Под влиянием последнего индуцируется секреция ИЛ-2, повышающего хелперные функции Т-клеток и стимулирующего натуральные киллеры. Активированные лимфоциты усиленно адгезируют тромбоциты, и, благодаря ретракции последних, продвигаются далее через поврежденную стенку сосудов вглубь травмированного участка. При этом кровяные пластинки осуществляет трофическую и репаративную функции, секретирова в окружающую среду ряд ростовых факторов. К таким соединениям относятся фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), ангиопоэтин-1, эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), модулятор иммунного ответа — трансформирующий фактор роста бета (TGF β) [13–15].

Таким образом, лейкоцитарно-тромбоцитарная адгезия является важной биологической реакцией при рожистом воспалении, свидетельствующей об активации иммунокомпетентных клеток.

Выводы

1. У больных с рожистым воспалением существенно повышается продукция провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ФНО α и хемокина ИЛ-8.

2. При рожистом воспалении снижается способность лимфоцитов адгезировать на своей поверхности тромбоциты. Показатель и степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии являются более выразительными свидетелями функции иммунокомпетентных клеток при рожистом воспалении по сравнению с изменением числа лимфоцитов. Более тяжелое течение (эритематозно-буллезная форма) сопровождается большими сдвигами параметров лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

3. При рожистом воспалении увеличивается экспрессия тканевого фактора моноцитами периферической крови, обуславливая развитие гиперкоагуляции.

Литература

1. Валишин Д.А., Абдулов Р.Х., Мухаметов Р.Я., Абдулов Г.Р. Некоторые патогенетические аспекты рожи // Инфекционные болезни. 2007. 5. (2). 29–31.
Valishin D.A., Abdulov R.Kh., Mukhametov R.Ya., Abdulov G.R. Some pathogenetic aspects of erysipelas // Infektsionnye bolezni. 2007. 5. (2). 29–31.
2. Ратников Л.И., Жамбурчинова А.Н., Лаврентьева Н.Н. Современная клиничко-эпидемиологическая характеристика рожи // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007. 2. 16–21.
Ratnikov L.I., Zhaburchinova A.N., Lavrent'eva N.N. Modern clinical epidemiological characteristic of erysipelas // Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. 2007. 2. 16–21.
3. Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н., Витковский Ю.А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма // Тромбоз, гемостаз и реология. 2005. (2). 3–14.
Kuznik B.I., Tsybikov N.N., Vitkovsky Yu.A. United cellular humoral system of organism protection // Tromboz, gemostaz i reologiya. 2005. (2). 3–14.
4. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования. Иммунология. 1999. 4. 35–37.
Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Phenomena of lymphocytic platelet rosette formation. Immunologiya. 1999. 4. 35–37.
5. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Солпов А.В. Адгезивные молекулы и лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия // Вестник гематологии. 2006. II. (2). 42–55.
Kuznik B.I., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.V. Adhesive molecules and leukocytic platelet interactions // Vestnik gematologii. 2006. II. (2). 42–55.
6. Витковский Ю.А., Солпов А.В., Кузник Б.И. Влияние цитокинов на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию // Медицинская иммунология. 2002. 4. (2). 135–136.

Vitkovsky Yu.A., Solpov A.V., Kuznik B.I. Influence of cytokines on lymphocytic platelet adhesion // *Meditinskaya immunologiya*. 2002. 4. (2). 135–136.

7. *Солпов А.В.* Влияние про- и противовоспалительных цитокинов на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию // *Забайкальский медицинский вестник*. 2002. (1). 14–17.

Solpov A.V. Influence of pro- and antiphlogistic cytokines on lymphocytic platelet adhesion // *Zabaikal'skii meditsinski vestnik*. 2002. (1). 14–17.

8. *Витковский Ю.А., Солпов А.В., Шенкман Б.З., Кузник Б.И.* Влияние интерлейкинов 1b, 2, 10 и 16 на взаимодействие лимфоцитарно-тромбоцитарных

агрегатов с экстрацеллюлярным матриксом // *Иммунология*. 2006. (3). 141–143.

Vitkovsky Yu.A., Solpov A.V., Shenkman B.Z., Kuznik B.I. Influence of interleukins 1b, 2, 10 and 16 on interaction between lymphocytic platelet aggregates and extracellular matrix // *Immunologiya*. 2006. (3). 141–143.

9. *Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В.* Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // *Медицинская иммунология*. 2006. 8. (5–6). 745–753.

Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Pathogenic significance of lymphocytic platelet adhesion// *Meditinskaya immunologiya*. 2006. 8. (5–6). 745–753

PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES, LYMPHOCYTE-PLATELET ADHESION AND TISSUE FACTOR EXPRESSION IN PATIENT WITH ERYSIPELAS

Al'vina Nikolaevna EMELYANOVA, Yuriy Antonovich VITKOVSKY

*Chita State Medical Academy
39a, Gor'kogo str., Chita, 672090*

Content of pro-inflammatory cytokines, lymphocyte-platelet adhesion and tissue factor expression by leukocytes of peripheral blood in patient with erysipelas were studied. It was established that productions of pro-inflammatory cytokines IL1a, IL1b, TNFa and chemokine IL8 are extent elevated. In erysipelas the lymphocytes ability to adhere platelets on it surface is decreased. Index and degree of lymphocyte-platelet adhesion are most extent signs of the function of immunocompetent cells in comparison with count of lymphocytes in erysipelas. It was established that in patients with bullous form of erysipelas the parameters of lymphocyte-platelet adhesion change more than in erytematous. In erysipelas the tissue factor expression by monocytes of peripheral blood increased, that led to hypercoagulability.

Keywords: erysipelas, lymphocyte-platelet adhesion, pro-inflammatory cytokines, tissue factor.

Emelyanova A.N. — *Candidate of Medical Sciences, assistant professor of the infection diseases chair*
Vitkovsky Yu.A. — *Doctor of Medical Sciences, professor, e-mail: yuvitkovsky@rambler.ru*