

**INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ZAKŁAD CHIRURGII TRANSPLANTACYJNEJ**



Grzegorz Szczęsny

2S 198
H3069

**UDZIAŁ UKŁADU CHŁONNEGO KOŃCZYNY W
PATOMECHANIZMIE TZW. OBRZĘKU POURAZOWEGO**

Praca doktorska

Promotor

Prof.dr hab.n.med. Waldemar L.Olszewski

Warszawa 1999

- Panu Profesorowi dr hab. med. Waldemarowi L. Olszewskiemu za opiekę naukową, wnikliwą dyskusję nad wynikami i cenne sugestie w trakcie przygotowywania pracy,

- Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chirurgii Transplantacyjnej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz Oddziału Ortopedyczno – Urazowego Szpitala Czerniakowskiego w Warszawie za okazaną mi pomoc i koleżeńską atmosferę podczas zbierania materiałów i wykonywania doświadczeń,

- mojej rodzinie za cierpliwość i wyrozumiałość

Serdecznie dziękuję

Grzegorz Szczęsny

UŻYTE W PRACY SKRÓTY

- α 1-PI - (α 1 – plasminogen inhibitor) – inhibitor plazminogenu α 1
 α 2-M - (α 2 – macroglobulin) – α 2-makroglobulina
 α 2-PI - (α 2 – plasminogen inhibitor) – inhibitor plazminogenu α 2
5-HT - (5-hydroksytryptamin) - serotonina
ADP - (adenosine diphosphate) – adenzynodwufosforan
AP - (Alkaline Phosphatase) – fosfataza zasadowa
APAAP - (Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase) – fosfataza alkaliczna – anty – fosfataza alkaliczna
a-FGF - (acidic Fibroblast Growth Factor) – kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów
ATP - (Adenosine Triphosphate) - adenzynotrójfosforan
b-FGF - (basic Fibroblast Growth Factor) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BMC - (Bone Marrow Cells) - komórki szpiku kostnego
BMP - (Bone Morphogenic Protein) – białko morfogenetyczne kości
C1-INH - (C1-inhibitor) – inhibitor składnika C1 dopełniacza
C1q, C3 i C5 - składniki dopełniacza C1q, C3 i C5
C3a i C5a - aktywne składniki układu dopełniacza
CD44, CD54 - (Cluster Of Differentiation 44, 54) – antygeny powierzchniowe 44, 54
CGRP - (Calcitonin – gene related proteins) - białka o strukturze podobnej do kalcytoniny
ConA - konkawalina A
CR1 - receptor składnika składnika C1 dopełniacza
CRP - (C-Reactive Protein) – białko C-reaktywne
DFCS - (Decomplemented Fetal Calf Serum) - surowica cielęca pozbawiona dopełniacza.
D-PBS - (Dulbecco PBS, Gibco) - Dulbecco buforowany roztwór fizjologiczny soli
EDRF - (Endothelial Derived Relaxation Factor) - czynnik rozkurczowy pochodzenia śródbłonkowego
EDTA - (Ethylenediaminetetraacetic Acid) - kwas etyleno-dwuamino-czteroacetylowy
EGF - (Epithelial Growth Factor) – czynnik wzrostu nabłonków
FACS - (Fluorescence Activated Cell Sorter) - cytometr przepływowy
FCS - (Fetal Calf Serum) - płodowa surowica cielęca
FDP - (Fibrinogen Degradation Products) – produkty degradacji fibrynogenu
FGF - (Fibroblast Growth Factor) – czynnik wzrostu fibroblastów
FITC - (Fluoresceine isothiocyanate) - izotiocianinian fluoresceiny
G-CSF - (Granulocyte - Colony Stimulating Factor) – czynnik stymulujący komórki linii granulocytarnej
GH - (Growth Hormone) - hormon wzrostu
GM-CSF - (Granulocyte / Macrophage Colony Stimulating Factor) – czynnik stymulujący komórki linii granulocytarnej - makrofagalnej
GP-Ib i GP-Ia – (Glycoproteins Ia i Ib) - glikoproteiny Ia i Ib
GTP - (Guanidiphosphate) – guaninotrójfosforan
HEPES - (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) - kwas hydroksy-etylo-piperazyno-etano-sulfonowy
HGF - (Hemopoietic Growth Factor) – hemopoetyczny czynnik wzrostu
IFN- γ - interferon γ
IgA - immunoglobulina A

- IGF - (Insulin-like Growth Factor) - Somatomedyna
IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL8, IL-11, IL13 - interleukiny 1, 2, 4, 6, 8, 11 i 13
IP10 - (Interferon-gamma-inducible Protein of 10 kDa) – białko indukowane przez IFN- γ
LN - (lymph node) - węzeł chłonny
LPS - lipopolisacharydy
Lsg - limfocytygrafia
MCP - (Monocyte Chemoattractant Protein) – białka chemoatrakcyjne monocytów
M-CSF - (Macrophage – Colony Stimulating Factor) - czynnik stymulujący komórki linii makrofagalnej
MDGF - (Macrophage Derived Growth Factor) – makrofagalny czynnik wzrostu
MIG - (Monokine Induced by IFN-gamma) – monokina indukowana przez IFN- γ
MIP-1 α - (Macrophage Inflammatory Protein-1) – białko zapalne makrofagów
NDS - (Normal Dog Serum) - surowica psa
NRaS - (Normal Rat Serum) - surowica szczura
NRbS - (Normal Rabbit Serum) - surowica królika
NSS - (Normal Swine Serum) - surowica świni
OP-1 - (Osteogenic Protein – 1) - białko osteogenne – 1
PAF - (Platelet Activating Factor) – czynnik aktywujący płytki
PAI-1 - (Plasminogen Activator Inhibitor – 1) – 1-szy inhibitor aktywatora plazminogenu
PBM - (Peripheral Blood Mononuclears) – mononukleary krwi obwodowej
PBS - (Phosphate Buffered Saline) – buforowany roztwór fizjologiczny soli
PDGF - (Platelet Derived Growth Factor) – płytkopochodny czynnik wzrostu
PF2 i PF4 - (Platelet Factor 2 i 4) – płytkowe czynniki 2 i 4
pGE₂, pGF_{2 α} , pGG₂, pGH₂ – prostaglandyny E₂, F_{2 α} , G₂ i H₂
pGI₂ - prostacyklina
PHA - (Phytohemagglutinin) - fitohemaglutynina
PMN - (Polymononuclear Cells) – granulocyty wielojądrzaste
pO₂ - (partial O₂) – ciśnienie parcialne tlenu
PWM - (Pokweed mitogen) - antygen szkarłatki
RAM - (Rat anti Mouse) - szczurze przeciwciało przeciw antygenom mysim
RPMI 1640 - pożywka do hodowli tkankowej
SCF - (Stem Cell Factor) – czynnik aktywujący komórki macierzyste (stem cells)
TBS - (Tris Buffered Saline) – roztwór soli fizjologicznej buforowany Tris
TF - (Tissue Factor) - czynnik tkankowy
TGF- α - (Transforming Growth Factor- α) - czynnik transformujący α
TGF- β - (Transforming Growth Factor- β) - czynnik transformujący β
TNF- α - (Tumor Necrosis Factor- α) – czynnik martwicy nowotworu
t-PAI, u-PA – aktywatory plazminogenu typu tkankowego i urokinazy
TxA₂ - tromboksan A₂
Usg - ultrasonografia
vWf - czynnik vonWillebranda
ZS - Zespół Sudecka

SPIS TREŚCI

UŻYTE W PRACY SKRÓTY	2
SPIS TREŚCI	4
I. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	6
A. CZĘŚĆ KLINICZNA:	8
B. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	8
II. WSTĘP.....	9
a). Krzepnięcie wynaczynionej w miejscu urazu krwi i uwalniane mediatory.....	9
b). Substancje zwiększające przepuszczalność kapilarną w miejscu urazu	12
c). Chemotaksja w ranie.....	13
d). Komórki odpornościowe wynaczyniane w miejscu urazu.....	13
e). Cytokiny w płynie tkankowym w ranie wewnętrznej.....	15
f). Aktywacja komórek w ranie	16
<u>PROCES GOJENIA ZŁAMAŃ KOŚCI</u>	<u>17</u>
<u>CYTOKINY SZPIKU KOSTNEGO.....</u>	<u>20</u>
<u>ZAKRZEPICA ŻYLNĄ.....</u>	<u>20</u>
<u>ODRUCHOWA DYSTROFIA WSPÓLCZULNA (ALGODYSTROFIA, ZESPÓŁ SUDECKA).....</u>	<u>21</u>
III. MATERIAŁ I METODY	26
<u>III.I. CZĘŚĆ KLINICZNA</u>	<u>26</u>
III.I.1. Ocena stanu klinicznego:	26
III.I.2. Zastosowane metody diagnostyczne i pomiarowe	27
<u>III.II.1. Schemat planowanych obserwacji.....</u>	<u>31</u>
III.II.2.1. <u>Badanie wpływu bezpośredniego wstrzyknięcia krwi żyłnej do naczynia chłonnego na struktury anatomiczne naczyń chłonnych i węzła chłonnego kończyny.....</u>	<u>33</u>
III.II.2.2. <u>Badanie wpływu podskórnego wstrzyknięcia krwi żyłnej na skład morfotyczny chłonki przedwzłowej.....</u>	<u>35</u>
III.II.2.3. <u>Badanie dynamiki transportu podanych podskórnie erytrocytów, leukocytów i płytek układem naczyń chłonnych.....</u>	<u>36</u>
III.II.2.4. <u>Badanie zmian morfologicznych zachodzących w skórze i tkance podskórnej pod wpływem podskórnego podania komórek krwi i szpiku kostnego.....</u>	<u>39</u>
III.II.2.5. <u>Badanie in vitro wpływu leukocytów krwi obwodowej i komórek szpiku kostnego na aktywację komórek węzła chłonnego.....</u>	<u>41</u>
III.II.2.6. <u>Badanie wpływu przewlekłego podawania podskórnie szczepów bakterii zasiedlających skórę łapy psa na struktury anatomiczne naczyń i węzłów chłonnych ocenianych metodą limfograficzną i immunohistochemiczną.....</u>	<u>43</u>
III.II.2.7. <u>Badanie pobudzenia in vitro komórek węzła chłonnego atenuowanymi szczepami bakterii zasiedlających skórę łapy psa metodą hodowli limfocytów.....</u>	<u>45</u>
III.II.2.8 <u>Zastosowane techniki statystyczne.....</u>	<u>48</u>
IV. WYNIKI	49
<u>IV.I. CZĘŚĆ KLINICZNA</u>	<u>49</u>
IV.I.1. Chorzy	49
<u>IV.II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</u>	<u>53</u>
IV.II.2.5. <u>Badanie in vitro wpływu leukocytów krwi obwodowej i komórek szpiku kostnego na aktywację komórek węzła chłonnego.....</u>	<u>56</u>

<i>IV.II.2.6. Badanie wpływu przewlekłego podawania podskórnie szczepów bakterii zasiedlających skórę łapy psa na struktury anatomiczne naczyń i węzłów chłonnych ocenianych metodą limfograficzną i immunohistochemiczną.....</i>	56
<i>IV.II.2.7. Badanie pobudzenia in vitro komórek węzła chłonnego atenuowanymi szczepami bakterii zasiedlających skórę łapy psa w hodowli limfocytów.....</i>	58
V. DYSKUSJA.....	60
VI. WNIOSKI.....	74
VII. TABELE	75
VIII. PIŚMIENNICTWO.....	86
IX. RYCINY.....	94

I. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Zmiany w kończynach dolnych w następstwie urazu mechanicznego stanowią ogromny problem leczniczy ze względu na upośledzenie funkcjonalne kończyny oraz przewlekłość procesu. Dotyczą one zarówno przypadków bez złamania kości jak i z nim. Zewnętrznym objawem zmian pourazowych jest przewlekły obrzęk kończyny. Jego nasilenie jest zwykle większe u osób ze złamaniem kości, a więc uszkodzeniem większej masy tkanek i otwarciem jamy szpikowej. Obrzęk pourazowy różni się znacznie od innych typów obrzęków kończyn, takich jak obrzęki w zastoju żylnym lub limfatycznym. W przypadku obrzęku pourazowego mamy do czynienia z gojeniem się rany wewnętrznej uszkodzonych kości i tkanek miękkich, natomiast w obrzękach żylnych i limfatycznych jedynie z zaburzeniami odpływu płynu z kończyny, bez gojenia się tkanek. Mimo klinicznie podobnego wyglądu obrzmiałej po urazie kończyny jak w innych obrzękach, przebieg procesów patofizjologicznych, których następstwem jest obrzęk pourazowy determinuje jego odrębność. Proces ten jest niejasny, trudny do kontrolowania, mało poznany. Wydaje się, iż dominują w nim długotrwałe zjawiska o charakterze zapalnym. Utrzymuje się on pomimo widocznego klinicznie zrostu kości czy tkanek miękkich.

Patomechanizm rozwoju pourazowych obrzęków kończyn dolnych nie był dotychczas dokładnie badany. Niewątpliwie, tak jak w każdym obrzęku tkanki, zasadniczy udział w jego rozwoju i utrzymywaniu się bierze układ chłonny kończyny regulujący objętość płynu pozakomórkowego i reagujący na uwolnione własne antygeny tkankowe oraz antygeny obce wnikające do tkanki. Dynamika rozwoju oraz kliniczny obraz obrzęku pourazowego różnią się zdecydowanie od tych w obrzękach rozwijających się w zastoju żylnym, lub przy utrudnionym odpływie limfatycznym. Stąd też konieczne jest różnicowanie obrzęków za pomocą obiektywnych metod rozpoznawczych. Jest to niezbędne dla planowania właściwego leczenia. Wiadomo, iż obrzęk pourazowy rozwija się natychmiast po urazie i powiększa w ciągu pierwszych miesięcy, zwłaszcza w okresie unieruchomienia kończyny. Obrzęk rozwijający się w następstwie zakrzepicy żył kończyn dolnych postępuje powoli w ciągu tygodni, po początkowym krótkim, ostrym okresie, i obejmuje tkanki miękkie okolicy stawu skokowego i dolnej części podudzia, zaś obrzęk limfatyczny pojawia się bardzo powoli i początkowo widoczny jest jedynie na grzbiecie stopy. Ta powierzchowna ocena nie pozwala jednak na postawienie właściwego rozpoznania.

Badanie etiopatogenezy obrzęku pourazowego kończyn dolnych wymaga zarówno badań klinicznych jak i doświadczalnych, w tym oceny procesu gojenia się rany kostnej, tworzenia

kostniny, udziału cytokin pro i antyzapalnych oraz czynników wzrostu, udziału komórek odpornościowych typu makrofagów i limfocytów oraz roli pełnionej przez nie w procesie osteogenezy, roli czynników humoralnych w gojeniu się tkanek miękkich, następstw zakażenia w miejscu urazu drobnoustrojami wnikającymi do tkanek z powierzchni uszkodzonej skóry i przynoszonych do miejsca urazu drogą naczyń chłonnych. Gojenie się rany wewnętrznej uruchamia nie tylko lokalne procesy regulacyjne, ale także wpływa na ogólnoustrojową regulację odpornościową. Wynika stąd konieczność badania reakcji zarówno obwodowego jak i centralnego układu chłonnego na zmiany tkankowe w miejscu urazu.

Celem niniejszej pracy było zbadanie odpowiedzi obwodowego układu chłonnego na miejscowe zmiany pourazowe, a w szczególności sprawdzenie koncepcji, zgodnie z którą przewlekły obrzęk pourazowy jest powikłaniem wynikającym z istnienia przewlekłego procesu zapalnego toczącego się w miejscu doznania urazu mechanicznego.

W części klinicznej swojej pracy postanowiłem zastosować metody, które pozwoliłyby obiektywnie rozpoznać obrzęk pourazowy u chorych z przewlekłymi obrzękami pourazowymi kończyn dolnych. Skojarzyłem metody pomiarów temperatury skóry kończyny (termografia), elastyczności tkanek (tonometria), limfoscyntygrafii (ocena naczyń chłonnych i pośrednio przepływu chłonki) oraz ultrasonografii żył (ocena anatomii żył, przepływu żylnego oraz ew. zmian zakrzepowych). W interpretacji uzyskanych danych podstawowym pytaniem, jakie sobie zadałem było, czy w miejscu urazu z rozwiniętym obrzękiem mamy do czynienia z przewlekłym procesem zapalnym i jaki jest w nim udział układu chłonnego kończyny. Wstępne wyniki badań klinicznych wykazały, że w efekcie miejscowego urazu mechanicznego w obrębie kończyny nie stwierdza się przerwania ciągłości naczyń chłonnych, natomiast widoczne jest znaczne ich rozszerzenie oraz zwiększenie masy pachwinowych i biodrowych węzłów chłonnych. Te obserwacje wraz ze stwierdzeniem podwyższonej ciepłoty w miejscu obrzęku oraz podwyższone parametry tonometryczne wskazały, iż obrzęk pourazowy może być przede wszystkim obrzękiem zapalnym. Zdecydowałem więc zbadać większą grupę chorych aby potwierdzić te wstępne obserwacje. Jednocześnie postanowiłem zbadać niektóre elementy patomechanizmu powstawania obrzęku pourazowego w warunkach doświadczalnych na zwierzętach, a w szczególności udział drenujących miejsce urazu naczyń i węzłów chłonnych, których znaczne powiększenie obserwowałem u chorych.

W miejscu urazu mechanicznego mamy do czynienia z co najmniej trzema elementami zmian tkankowych. Są nimi: 1 krwaki formowany wskutek wynaczynienia krwi z uszkodzonych naczyń krwionośnych, ewakuacja szpiku kostnego przy złamaniach kości i otwarciu jamy

szpikowej oraz zakażenie mikroorganizmami wnikającymi do tkanek w miejscu urazu lub przynoszonymi do tych tkanek drogą limfatyczną z obwodu kończyny. Zaplanowałem więc zbadanie, czy wynacznienie krwi i szpiku kostnego powoduje miejscowe zmiany w skórze i tkance podskórnej, czy elementy morfotyczne krwiaka wchłaniają się drogą naczyń limfatycznych i czy wywołują zmiany w naczyniach i węzłach chłonnych, oraz czy drobnoustroje z powierzchni skóry w miejscu urazu powodują zmiany w skórze i tkance chłonnej.

W tym celu wykonałem doświadczenia, w których zastosowałem metodę limfografii bezpośredniej z komputerową oceną obrazów, techniki cytometrii komórkowej do oceny populacji komórkowych krwiaka drenowanych drogą limfatyczną, metody immunohistochemiczne dla oceny zmian zapalnych w tkankach oraz metody bakteriologiczne dla identyfikacji bakterii oraz ich pobudzającego wpływu na limfocyty węzłów chłonnych.

W pracy postawiłem sobie następujące pytania:

A. Część kliniczna:

1. jakie zmiany rozwijają się w kończynie po urazie mechanicznym, w szczególności w układzie naczyń i węzłów chłonnych odprowadzających nadmiar wytwarzanego płynu tkankowego i chłonki i zatrzymujących migrujące komórki odpornościowe i ich produkty.

B. Część doświadczalna

2. czy wynaczniona krew powoduje zmiany w skórze i układzie chłonnym.
3. jaka jest kinetyka wchłaniania morfotycznych elementów krwiaka drogą chłonną.
4. jak wpływa wynaczniona tkanka szpikowa na skórę i węzły chłonne.
5. jaki wpływ mają drobnoustroje normalnie zasiedlające skórę na tkanki w miejscu urazu oraz drenujące tę okolicę naczynia i węzły chłonne.

Udzielenie odpowiedzi na postawione pytania kliniczne i doświadczalne pozwoliłoby na dalsze zrozumienie patomechanizmu obrzęku pourazowego, a w szczególności roli układu chłonnego w tym procesie. Dałoby także podstawę do prowadzenia w przyszłości na poziomie molekularnym badań dotyczących przede wszystkim ewentualnej roli wynacznionych populacji szpikowych i cytokin hemopoetycznych w utrzymywaniu się procesu zapalnego.

II. WSTĘP

Wstęp jest zbiorem doniesień związanych tematycznie z pracą dotyczących czynników komórkowych i humoralnych gromadzących się w tkankach kończyny ulegającej urazowi, a następnie transportowanych drogą naczyń chłonnych do węzłów chłonnych i wywołujących w nich zmiany patologiczne. Obejmuje on także zagadnienia gojenia się rany tkanek miękkich i rany kostnej, w tym w szczególności wynaczyniania komórek i wydzielania przez nie czynników humoralnych regulujących procesy reparacyjne, przenoszonych z prądem chłonki do węzłów chłonnych. W przypadku uszkodzenia kości istotne jest zagadnienie przedostawania się komórek szpiku do tkanek miękkich i wydzielanych przez te komórki cytokin. W procesie gojenia się rany ważny jest problem aktywacji układu krzepnięcia i tworzenia się zakrzepów, ponieważ czynniki krzepnięcia i fibrynolizy oraz produkty ich degradacji mają wpływ na obwodowy układ chłonny. Cytowane są również poglądy na temat patomechanizmu zespołu Sudecka oraz roli układu nerwowego w przebiegu miejscowego procesu zapalnego

Proces gojenia zamkniętych ran tkanek miękkich.

Proces gojenia ran tkanek miękkich przebiega w sekwencji następujących po sobie procesów. Są nimi: a). krzepnięcie wynaczynionej krwi, b). zwiększona przepuszczalność kapilarna, c). chemotaksja i d). migracja z naczyń do tkanki komórek odpornościowych, e). wydzielanie cytokin i czynników wzrostu oraz f). pobudzenie komórek naciekających i mięszowych.

a). Krzepnięcie wynaczynionej w miejscu urazu krwi i uwalniane mediatory

Bezpośrednio po zadziałaniu czynnika uszkodzającego w miejscu urazu dochodzi do przerwania ciągłości ścian naczyń krwionośnych. Dochodzi do wynaczyniania krwi hamowanego przez proces kontaktowej aktywacji płytek, czego efektem jest wytworzenie hemostatycznego czopa płytkowego. Prowadzi to do degranulacji ziarnistości (α , β i γ) płytek krwi i uwolnienia ich zawartości. Ziarnistości typu α zawierają wiele czynników krzepnięcia (m.in. fibrynogen, cz. V, XIII, von Willebranda i wysokocząsteczkowy kininogen), czynniki płytkowe (PF2 i PF4), β -tromboglobulinę, PDGF, TGF- β , trombospondynę i fibronektynę, czynniki chemotaktyczne, przeciwbakteryjne i czynniki zwiększające przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz inhibitory osoczowych proteinaz (C1-INH, α 2-PI, α 1-PI, α 2-M, białko S i PAI-1). Ziarnistości typu β zawierają m.in. nukleotydy: ADP, ATP i GTP, jony: Ca^{++} , K^{+} , Mg^{++} ,

HPO₄²⁻ oraz serotoninę, zaś ziarnistości typu γ liczne enzymy: m.in. kolagenazę, katepsyny, β -heksozamidazę, β -glukuronidazę, β -galaktozydazę, β -arabinozydazę i arylosulfatazę [1].

Aktywacja płytek krwi zachodzi wskutek pierwotnego działania na nie agonistów, lub wtórnego - „kontaktowego”. W procesie aktywacji płytek po uszkodzeniu ściany naczynia uwalnia się z komórek śródbłonkowych czynnik von Willebranda i odsłonięte zostają włókna kolagenu. Łączą się one z receptorami błonowymi GP-Ib i GP-Ia, co powoduje degranulację ziarnistości α , β i γ płytek oraz zmianę kształtu i właściwości ich błon komórkowych. Powoduje to agregację trombocytów i powstanie hemostatycznego czopu płytkowego. Czynnikiem zapobiegającym przyleganie i aktywację „kontaktową” jest ujemne spolaryzowanie błony komórkowej zarówno płytek jak i komórek śródbłonkowych oraz wytwarzane przez komórki śródbłonka prostacyklina (pGI₂) i EDRF. Innymi czynnikami mogącymi aktywować płytki są trombina, kwas arachidonowy, tromboksan (TXA₂), pGG₂, pGH₂, PAF, wazopresyna, serotonina, adrenalina, noradrenalina, kompleksy immunologiczne, wirusy i bakterie oraz uwolniony podczas hemolizy z erytrocytów ADP.

Wskutek kontaktu płytek krwi z zawartym w przestrzeni pozanaczyniowej czynnikiem tkankowym (tromboplastyną, TF) dochodzi do aktywacji w mechanizmie zewnątrzpochodnym kaskady układu krzepnięcia i wytworzenie w przeciągu ok. 10 sekund skrzepu [2]. Istotą tego wieloetapowego procesu jest wytworzenie z fibrynogenu przestrzennej sieci włókien fibryny (włóknika). Proces ten jest katalizowany przez trombinę - enzym aktywowany z obecnego w surowicy zymogenu (protrombiny) przez czynnik Xa (Davie i wsp. 1991) [3]. U podstaw aktywacji wszystkich czynników krzepnięcia jest ich ograniczona proteoliza, prowadząca do powstania peptydów aktywacyjnych, mających zdolność kaskadowej aktywacji kolejnych czynników kaskady układu krzepnięcia (Furie i Furie 1988) [4].

W ludzkim osoczu stężenie protrombiny jest około 100-krotnie większe niż stężenie wystarczające do aktywacji kaskady układu krzepnięcia. Istnienie układu fibrynolitycznego zapobiega jego nadmiernej aktywacji. Głównym składnikiem układu fibrynolitycznego jest plazmina – enzym proteolityczny trawiący wiele białek osocza, płynów ustrojowych, powierzchni komórek i tkanki łącznej. Powstaje ona dzięki aktywacji z zymogenu (plazminogenu) przez biorący udział w kaskadzie krzepnięcia aktywny czynnik XIIa lub kallikreinę [Wachtfogel i wsp. 1993][5]. Kallikreina z kolei ma zdolność degradacji czynnika XIIa w postaci β XIIa i XIIIf, dwułańcuchowej proteazy, która ma znikomą aktywność w kaskadzie układu krzepnięcia, za to wydajnie aktywuje plazminogen. Plazmina jest proteazą serynową o szerokiej swoistości – trawi wiele białek uczestniczących w hemostazie (fibrynogen,

fibrinę, cz.XII, V i VIII, vWf oraz glikoproteiny powierzchni płytek [6]. Powstałe w wyniku degradacji fibrynogenu i fibryny produkty (FDP) wywierają z kolei wpływ na różnorodne procesy biologiczne. Drobnocząsteczkowe FDP działają chemotaktycznie na leukocyty, działają immunosupresyjnie i cytotoksycznie wobec komórek śródbłonkowych. Stwierdzono również bezpośrednią aktywację makrofagów przez produkty degradacji fibrynogenu, głównie ich formę D (FDP-D), czego efektem jest uwolnienie przez te komórki cytokin. [7, 8]

Istnieje wiele dowodów na powiązania układu krzepnięcia z innymi układami, m.in. z układem dopełniacza. Aktywacja układu dopełniacza może przebiegać na drodze aktywacji jego składnika C1 bez udziału przeciwciał przez lipopolisacharydy (LPS)[9], obecne w ranie bakterie Gram(-) (np. E.coli) i białko C-reaktywne (CRP). Efektem działania układu dopełniacza są bezpośrednia liza obecnych w ranie bakterii, chemotaksja komórek zapalnych (głównie granulocytów obojętnochłonnych) w kierunku wzrastającego stężenia czynnika chemotaktycznego, degranulacja komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych jak również aktywowanie leukocytów. Swoje działanie układ dopełniacza wywiera dzięki obecnym w błonie komórkowej receptorów - głównie CR1 (zwany też C3bR) i CR3. Stwierdzono, że w wyniku aktywacji granulocytów obojętnochłonnych liczba receptorów CR1 gwałtownie rośnie, czego efektem jest zwiększona podatność na działanie chemotaktyczne składników układu dopełniacza. Aktywacja układu dopełniacza prowadzi do agregacji płytek krwi i monocytów i wzajemnej ich aktywacji, czego efektem jest wytwarzanie czynnika tkankowego - on z kolei aktywuje kaskadę układu krzepnięcia[10]. Z kolei inaktywacja układu dopełniacza w wyniku bezpośredniej inaktywacji jego składników C1q, C3 i C5 [11] przez plazminę oraz C1, C5 i czynnika B przez kallikreinę umożliwia hamowanie procesów lizy i postępowanie procesu naprawy uszkodzonej tkanki.

Trombina, kluczowy enzym wytwarzany w miejscach uszkodzenia śródbłonnków naczyń w procesie aktywacji kaskady układu krzepnięcia wywiera, poza samą aktywacją fibrynogenezy, również silne działanie na inne układy i komórki [12]. Efektem jej działania jest wzrost przepuszczalności śródbłonnków naczyń [13, 14, 15], wzmaganie agregacji płytek i leukocytów do ścian naczyń krwionośnych [16, 17, 18] oraz działanie chemotaktyczne w stosunku do leukocytów. Trombina wywiera również działanie mitogenne w stosunku do komórek śródbłonkowych [19], fibroblastów i komórek mięśniówki gładkiej[20], jak również stymuluje te komórki do uwalniania substancji biologicznie czynnych. Trombina stymuluje m.in. komórki śródbłonkowe do wydzielania czynników hamujących formowanie skrzepu (prostacykliny i NO), jak również aktywatorów (PAF) i

inhibitorów (PAI-1) procesu agregacji płytek oraz aktywatorów układu fibrynolitycznego (t-PAI, u-PA)[²¹]. Poza tym wykazano, że trombina działając na różne populacje leukocytów, powoduje wydzielanie przez nie czynników chemotaktycznych [²²] i czynników wzrostu [²³]. Calotta i wsp. wykazali, że trombina działając na komórki śródbłonkowe i monocyty, powoduje wydzielanie przez nie czynnika chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1) [²⁴], zaś Benezra i wsp. wykazali, że działając w przestrzeni pozakomórkowej, trombina ma zdolność uwalniania i aktywowania z macierzy pozakomórkowej b-FGF [²⁵].

b). Substancje zwiększające przepuszczalność kapilarną w miejscu urazu

W wyniku urazu dochodzi do miejscowego uwolnienia z uszkodzonych tkanek histaminy i serotoniny, polipeptydów: bradykininy, kallikreiny, plazminy, prostaglandyn i leukotrienów oraz składników dopełniacza C3a i C5a oraz prawdopodobnie trypsyny. Uwalniana z komórek tucznych *histamina* powoduje rozszerzenie arteriol oraz znaczne zwiększenie funkcjonalnych porów między komórkami śródbłonka, co powoduje zwiększony transport pozakomórkowych składników krwi do przestrzeni międzykomórkowej. Część uwalnianej histaminy pochodzi z neutrofilów zasadochłonnych [^{26,27}]. *Serotonina* (5-HT) wywiera silne działanie na śródbłonki postkapilarnych naczyń żylnych (o średnicy 20-30 μm) powodując w krótkim czasie (już po ok. 60 sekundach) wzrost ich przepuszczalności dla elementów pozakomórkowych krwi. Pod wpływem jej działania w ścianach naczyń powstają pory („gaps”) o średnicy 0.1-1.0 μm [^{28,29}]. Uwalnienie enzymów proteolitycznych (w tym obecnej w surowicy krwi i płynie tkankowym kallikreiny) i ich aktywacja powodują między innymi powstanie z wysokocząsteczkowych białek osocza (kininogenów - kallidyny) bradykininy. *Bradykinina* wywiera działanie na komórki śródbłonka małych żył analogiczne do działania 5-HT, jednak jej działanie jest o wiele silniejsze. Jest ona jednak szybko rozkładana w tkankach przez karboksypeptydazę i enzym konwertujący (converting enzyme). Jej działanie, choć silne, jest jednak krótkotrwałe i trwa zaledwie kilka minut. *Prostaglandyny* są uwalniane niemal przez wszystkie tkanki do krwi i płynu tkankowego zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Chociaż część z nich wywiera działanie naczynioskurczowe efektem działania większości z nich jest rozkurczanie ścian naczyń krwionośnych. *Leukotrieny* powodują zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych doprowadzając do wynaczynienia osocza oraz ułatwiają adhezję leukocytów do komórek śródbłonkowych umożliwiając ich wynaczynienie. Wywierają również działanie chemotaktyczne w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych i kwasochłonnych

oraz monocytów. Powoduje również uwolnienie z lizosomów leukocytów wielu substancji mających duży wpływ na dalszy przebieg ostrej reakcji zapalnej [^{30, 31}].

c). Chemotaksja w ranie

Aktywacja płytek powoduje uwolnienie z ich ziarnistości α substancji wywierających silne działanie mitogenne i chemotaktyczne w stosunku do wielu komórek zapalnych, między innymi PDGF, TGF- β , EGF/TGF- α [³²], zaś obecny w błonie komórkowej płytek kwas arachidonowy metabolizowany jest do Tromboksanu A₂ (TxA₂) [³³].

Uwolnienie czynników chemotaktycznych (gł. TGF- β i innych) powoduje migrację granulocytów wielojądrzastych (PMN). Gromadzą się one już w 6 godzinie po urazie osiągając szczyt w 24 – 48 godzinie [³⁴]. Aktywowane neutrofile uwalniają czynniki zapalne, w tym mielo-peroksydazę i enzymy proteolityczne. Ich ilość maleje szybko w ranach czystych (od ok. 24 godz.); przy współistniejącym zakażeniu pozostają one dłużej. Działanie chemotaktyczne na granulocyty wywiera składnik dopełniacza C5a. Stwierdzono przedłużenie obecności granulocytów obojętnochłonnych w ranie także po wpływie działania trombiny, kallikreiny, zdenaturowanych białek macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen, fibronektyna, elastyna), leukotrienu B₄ i PF4 [^{35, 36, 37}].

Obecnie wiadomo, iż poza wyżej wymienionymi chemoatraktantami istnieje wielka rodzina chemokin i ich receptorów wytwarzanych nie tylko przez komórki odpornościowe, ale także przez różne komórki niehemopoetyczne. Jedna z podrodzin chemokin nosi symbol CXC, ponieważ grupy cysteinowe (C) są rozdzielone aminokwasem, druga została nazwana CC, nie posiadając aminokwasu między cysteinami. Obydwie podrodziny różnią się funkcjonalnie. Pierwsza jest aktywna w stosunku do granulocytów, druga do monocytów. Do podrodziny CXC należy IL8, GRO, IP10, PF4 i MIG zaś do podrodziny CC MCP1-4, MIP1 α , RANTES i eotalsyna. Chemokiny wykazują swoje działanie chemoatrakcyjne jedynie w niskich stężeniach i nieaktywują komórek [^{38, 39}].

d). Komórki odpornościowe wynaczyniane w miejscu urazu

Perwszą populacją komórek pojawiających się w ranie są granulocyty. Szczyt ich gromadzenia się ma miejsce w drugiej dobie po urazie, po czym ich ilość zmniejsza się. W prawidłowo przebiegających procesach naprawczych nie powinno ich być w ranie w 6 dobie po

urazie. Wraz z zanikaniem w ranie granulocytów obojętnochłonnych wzrasta w niej stężenie makrofagów. Makrofagi są monocytami krwi obwodowej ulegającymi migracji i chemotaksji do miejsc zapalnych pod wpływem PDGF uwalnianego z aktywowanych płytek krwi. Ich główną funkcją jest fagocytoza zniszczonych komórek i macierzy oraz unieczynnianie bakterii poprzez uwalnianie H_2O_2 , O_2 oraz NO [40]. Efektem ich działania jest zmniejszenie w ranie pO_2 i zakwaszenie środowiska w wyniku uwalniania kwasu mlekowego. Uwalniane z makrofagów cytokiny (PDGF, TGF- β , bFGF, EGF, IL-2, IL-6, IFN- γ , IGF) biorą udział w dalszych procesach aktywacji i migracji fibroblastów oraz komórek śródbłonkowych. Uwalniane z makrofagów TNF- α aktywując makrofagi, powoduje dalszy napływ tych komórek do rany [41]. Makrofagi wytwarzają także VEGF, FGF, KEGF oraz TNF- α biorące udział w procesie angiogenezy [42, 43, 44, 45]. Począwszy od 5 doby po zadziałania czynnika uszkodzającego rośnie ilość limfocytów T osiągając wartości maksymalne ok. 7 doby. Ich tropizm do miejsc zapalnych jest regulowany przez obecność na ich powierzchni molekuł takich jak LFA1, CD54 i CD44. Limfocyty wydzielają szereg interleukin, które działają na makrofagi i monocyty, przez co biorą

udział w procesach takich jak fibroplazja i angiogeneza [46, 47].

Tab.II.1 Efekt działania cytokin na aktywność fibroblastów. Z: Regan MC, Barbul A - *The cellular biology of wound healing*. W: Schlag G, Redl H - *Wound Healing*, Springer-Verlag 1994, 3-16

	<i>Proliferacja</i>	<i>chemotaksja</i>	<i>synteza kolagenu</i>
TGF- β	↑↓	↑	↑
bFGF	↑		↑
MDGF	↑	↑	
IL-1		↑	↑↓
PDGF	↑	↑	
TNF- α		↑	↑↓
PAF	↑		↑
IFN- α		↓	
IFN- β		↓	
IFN- γ	↑↓		↓

Cytokiny uwalniane przez aktywowane płytki, makrofagi i limfocyty T powodują migrację z okolicznej tkanki łącznej (głównie z przydanki naczyń krwionośnych) i proliferację w miejscu toczącego się procesu zapalnego fibroblastów. Fibroblasty widoczne są w ranie począwszy od 3 doby po urazie osiągając szczyt w 7 dobie. Syntetyzowane i uwalniane przez nie białka (kolagen, fibronektyna i kwas hialuronowy) stanowią macierz międzykomórkową

gojącej się rany i są odpowiedzialne za jej mechaniczną wytrzymałość. Efektem końcowym tej fazy gojenia rany jest powstanie ziarniny - bogato unaczynionej tkanki zawierającej fibroblasty i

komórki zapalne w trójwymiarowej sieci kolagenu. Dalsza przebudowa sieci kolagenu postępuje wzdłuż sił naprężeń sieci, zapewniając taką jej konfigurację, która zapewnia największą wytrzymałość mechaniczną (fibroplazja).

Równolegle wraz z fibroplazją postępuje angiogeneza i - o ile doszło do uszkodzenia nabłonka - reepitelializacja. Począwszy od drugiego dnia po urazie aktywowane przez obecne w ranie cytokiny komórki śródbłonkowe naczyń żylnych ulokowanych w tkankach przylegających do miejsca urazu migrują wzdłuż włókien kolagenu i fibronektyny skierowanych w kierunku centrum krwiaka. Komórki te proliferując tworzą kolumny komórek śródbłonkowych formujących charakterystyczne wypustki (*sprouts*). Łączą się one tworząc pętle naczyniowe (*capillary loops*). Początkowo sznury komórek śródbłonkowych stanowią pozbawione światła struktury. W przeciągu kilku godzin w wyniku tubulogenezy powstają z nich trójwymiarowe, cylindryczne struktury, którymi zaczyna płynąć krew. Prowadzi to do wytworzenia sieci naczyń włosowatych (*capillary plexus*). Gęsta początkowo sieć nowo powstałych naczyń krwionośnych daje charakterystyczny obraz dobrze unaczynionej ziarniny. Powstałe naczynia krwionośne są zbudowane jedynie z komórek śródbłonkowych i mają niewielką wytrzymałość mechaniczną. Z czasem większość z nowo powstałych naczyń zanika; pozostałe w przeciągu kilku tygodni ulegają przebudowie i zróżnicowaniu do w pełni wykształconych naczyń tętniczych i żylnych. Regulacyjną rolę odgrywają w tym procesie głównie bFGF i TNF- α .

e). Cytokiny w płynie tkankowym w ranie wewnętrznej

Płyn gromadzący się w ranie zawiera znaczne stężenia cytokin regulujących proces reparatorny. Z najważniejszych należy wyliczyć PDGF wpływający na proliferację, chemotaksję i wytwarzanie macierzy, EGF regulujący proces epitelializacji, TGF- α odpowiedzialny za angiogenezę i epitelializację, FGF pobudzający proliferację i angiogenezę oraz TGF- β regulujący wytwarzanie macierzy i proliferację komórkową. Istnieje znaczny zakres homologii między tymi cytokinami, co powoduje, że w miejscu urazu ma miejsce ich funkcjonalna współzależność. Poziom poszczególnych cytokin nie jest dowodem na ich aktualną aktywność. Mogą one pozostawać w formie nieaktywnej lub też być zdegradowane. Pomijając dotychczas aspektem efektu cytokinowego było nieuwzględnianie procesu odpływu cytokin z tkanek do węzłów chłonnych i aktywacji ich populacji komórkowych [48].

f). Aktywacja komórek w ranie

Aktywacja komórek odpornościowych jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu kolejnych faz gojenia zmian pourazowych. Biorą w nich udział głównie granulocyty obojętnochłonne, makrofagi i limfocyty, choć udział poszczególnych subpopulacji komórek dla prawidłowego przebiegu procesów regeneracyjnych jest różny. Granulocyty obojętnochłonne są pierwszymi komórkami migrującymi do tkanek poddanych urazowi. Są one stwierdzane już w pierwszej dobie po urazie. Ulegają one migracji wskutek aktywacji przez substancje takie jak aktywowane składniki dopełniacza, IL-1, TNF- α , TGF- β , PF-4 i czynniki bakteryjne dzięki istnieniu swoistych receptorów na powierzchniach komórek śródbłonkowych i granulocytów obojętnochłonnych. Istnienie tych receptorów pozwala na adhezję granulocytów obojętnochłonnych do ściany naczyń oraz ich marginację i migrację przez ścianę naczynia [49].

Aktywacja makrofagów prowadzi do usunięcia ciał obcych, uszkodzonych elementów tkanek i wynaczynionych elementów morfotycznych krwi oraz zapoczątkowania procesów naprawczych (angiogenezy). Pojawiają się one w uszkodzonych tkankach dzięki chemotaksji pod wpływem działania MIP-1 α [50] osiągając szczytowe stężenia w ranie w 3-5 dobie po urazie. Ich doniosłe znaczenie w procesach regeneracyjnych opiera się głównie na zdolności tych komórek do usuwania ciał obcych, bakterii kontaminujących ranę i *debris* komórkowego. Biorą one czynny udział w obronie przeciwbakteryjnej również poprzez syntezę rodników tlenkowych [51], zaś uwalniane z nich czynniki wzrostu aktywują fibroblasty, stymulując je do tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej [52]. Uwalniane z makrofagów czynniki wzrostu wykazują też działanie regulacyjne w stosunku do innych cytokin [53]. Poprzez uwalniane cytokiny makrofagi mają zdolność do bezpośredniej aktywacji limfocytów, które z kolei poprzez uwalniane limfokiny (interferon i interleukiny) aktywują monocyty / makrofagi wywołując wzrost uwalniania przez te komórki cytokin takich jak TNF- α i IL-1. Udowodniono, że obecność makrofagów i limfocytów [54] jest niezbędna dla przebiegu prawidłowego procesu naprawczego; obecność granulocytów obojętnochłonnych nie jest niezbędna [55].

Komórki tuczne są komórkami odpowiedzialnymi za występowanie późnych zmian zapalnych w tkankach po urazie. Migrując z okolicznych tkanek do miejsc toczącego się procesu zapalnego poprzez uwalniane substancje czynne i cytokiny zwiększają przepuszczalność śródbłonnków naczyniowych prowadząc do wystąpienia miejscowego obrzęku, odkładanie włókniaka i migrację leukocytów [56]. Swoje działanie wywołują poprzez uwalnianie histaminy, serotoniny, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6 i TNF- α [57, 58].

Poprzez współdziałanie poszczególnych subpopulacji komórek biorących udział w procesie miejscowego procesu zapalnego dochodzi do ich wzajemnej aktywacji na drodze parakrynnnej, co przedłuża obecność cytokin w miejscu uszkodzenia. Aktywacja fibroblastów zapewnia odbudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. W fazie proliferacyjnej gojenia ran aktywowane przez czynniki wzrostu (m.in. PDGF i EGF) fibroblasty ulegają migracji z okolicznych tkanek miękkich i proliferują w miejscu uszkodzenia.

Proces gojenia złamań kości

Możliwe są dwie drogi zrostu złamania kości. W przypadku złamań, w których w szparze przełomu nie dochodzi do żadnych napięć mechanicznych następuje pierwotny, „naczyniopochodny” zrostu polegającego na wrastaniu w miejscu złamania naczyń krwionośnych otoczonych komórkami mezenchymy i wytworzeniu tkanki kostnej [59,60]. Większość złamań ulega jednak procesowi gojenia na podłożu chrzęstnym [61], gdzie w fazie reperacji dochodzi do gwałtownej chondrogenyzy niezróżnicowanej tkanki mezenchymalnej i/lub aktywacji komórek osteo i chondroprogenitorowych okostnej z następującą mineralizacją i wytworzeniem tkanki kostnej.

W mechanizmie gojenia złamań kości główną rolę odróżniającą ten proces od gojenia ran tkanek miękkich odgrywają wewnątrzkomórkowe zmiany wywołane obciążeniem mechanicznym. Poprzez oddziaływania na błony komórkowe wywołują one szereg zmian w komórkach obecnych w tkance kostnej, stymulując je do wytwarzania i wydzielania substancji czynnych – w tym czynników wzrostu. Najlepiej poznanymi z czynników wzrostu biorącymi udział w zroście złamań są te z rodziny TGF- β . Są one białkami regulującymi powstawanie, indukcję i procesy naprawcze kości [62, 63, 64]. Wywierają one również wpływ na procesy chondrogenyzy [65]. TGF- β jest dimerem zbudowanym z podjednostek $\beta 1$ lub $\beta 2$, składającym się z łańcucha 112 aminokwasów o masie cząsteczkowej 25 kD wyciętym z 391-aminokwasowego prekursora. Jest on białkiem sekrecyjnym wydzielanym w postaci nieaktywnego prekursora, z którego „wycinana” jest forma aktywna poprzez działanie enzymów proteolitycznych lub czynników fizycznych takich jak wzrost temperatury i zakwaszenie środowiska [66]. TGF- β łączy się z trzema typami receptorów komórkowych oznaczonych jako I, II i III obecnymi na wszystkich komórkach organizmu. Wewnątrzkomórkowe fragmenty receptorów I i II są kinazą serynowo-treoninową, natomiast receptor typu III nazywany też betaglikanem jest zakotwiczonym błonowo proteoglikanem nie wywierającym żadnego wewnątrzkomórkowego działania - jego rola polega na prezentacji TGF- β pozostałym dwóm receptorom. Aktywacja receptora typu I-go wiąże się z

syntezą i odkładaniem macierzy zewnątrzkomórkowej, natomiast aktywacja receptora II-go - ze wzrostem i proliferacją komórki [67, 68, 69, 70, 71]. Opublikowane ostatnio wyniki doświadczeń wskazują, że TGF- β stymuluje chondrogenezę poprzez stymulację komórek pochodzenia okostnowego [72].

TGF- β jest najsilniejszym induktorem syntezy kolagenu typu I, II, III, V, VI i X oraz fibronektyny, osteopontyny, osteonektyny, trombospondyny, proteogliknów i fosfatazy alkalicznej przez fibroblasty *in vivo*. Zwiększa również ekspresję integryn na powierzchniach komórek. Udowodniono również jego hamujący wpływ na proteolizę okołokomórkową poprzez redukcję produkcji metaloproteinaz oraz zwiększanie ich tkankowych inhibitorów [62]. Poza tym TGF- β hamuje powstawanie i aktywację osteoklastów [73]. Wykazano również, że TGF- β stymuluje proliferację osteoblastów [74, 75].

TGF- β jest białkiem wiązany przez siarczan heparanu - w przestrzeni pozakomórkowej jest wiązany z białkami macierzy i magazynowany w postaci nieaktywnej [76]. Jego aktywacja zachodzi w wyniku działania enzymów proteolitycznych lub ekstremalnych wartości pH i uwolnienia z kompleksów z białkami macierzy. W efekcie działania osteoklastów na kość dochodzi - w wyniku enzymatycznej hydrolizy - do rozkładu białek macierzy i uwolnienia aktywnego TGF- β , który poprzez aktywację osteoblastów powoduje zapoczątkowanie procesów osteosyntezy i wytworzenie nowej macierzy zewnątrzkomórkowej. W procesie indukowania powstawania tkanki kostnej TGF- β wywiera swój wpływ raczej na procesy chondrogeny niż osteogenezy [77]. Wywołana podaniem egzogennej TGF- β chondrogenyza jest wynikiem wspólnego działania zarówno TGF- β jak i BMP, co wskazuje na ścisłe zależności pomiędzy tymi dwoma czynnikami [78].

Do rodziny TGF- β zaliczanych jest również wiele białek, między innymi białka morfogenetyczne kości (BMP). Są one podstawowymi czynnikami indukującymi procesy regeneracji tkanki kostnej we wszystkich przypadkach, w tym w procesach gojenia złamań poza procesami tworzenia kośćca zachodzącymi w wieku płodowym [79]. W przeciwieństwie do innych czynników wzrostu takich jak PDGF, TGF- β , IGF i innych BMP posiada zdolność indukowania komórek okołonaczyniowych tkanki łącznej, do tworzenia kości *de novo*, co w warunkach normalnych nie występuje. Stwierdzono, że jest ona kwaśnym białkiem zewnątrzkomórkowym związanym z kolagenem macierzy kości [80].

Spośród białek należących do rodziny BMP BMP-2 jest identyczna z osteogenną [81], a BMP-7 z białkiem osteogennym-1 (OP-1 [82]). Udowodniono, że białko osteogenne podane do

szpary przełomu w przypadkach dużych ubytków tkanki kostnej powoduje ich szybsze gojenie niż po zabiegu przeszczepienia kości [83].

Wpływ czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) na wzrost syntezy DNA i poprzez to na procesy proliferacji i migracji wielu komórek, w tym śródbłonek naczyń i komórek mezodermalnych (tkanki kostnej i chrzęstnej) znany jest od dawna [84]. Istnieją dwie podstawowe formy czynnika wzrostu fibroblastów - kwaśna i zasadowa (*acidic* a-FGF (FGF-1) i *basic* b-FGF (FGF-2)) o 53% homologii, pozostające w dużym powinowactwie z heparyną. FGF występuje w wielu komórkach i tkankach organizmu - jego obecność udowodniono w wielu komórkach pochodzenia neuroektodermalnego i mezodermalnego [85, 86, 87, 88, 89]. Z kolei insulinopodobny czynnik wzrostu (Somatomedyna, IGF) odgrywa znaczną rolę w rozwoju układu szkieletowego poprzez regulowanie wzrostu komórkowego, regulowanego przez hormon wzrostu (GH) i wbudowywanie siarczanów w proteoglikany chrząstki. Białka tej grupy znajdują się w proliferujących chondrocytach chrząstek nasadowych, co sugeruje, że IGF-1 stymuluje ich ekspansję w strefie proliferacji poprzez działanie autokryne [90]. Wykazano, że IGF-1 powoduje stymulację replikacji komórek prekursorowych osteoblastów oraz indukcję produkowanego przez osteoblasty kolagenu [91].

Uwalniany z ziarnistości płytek krwi w wyniku ich degranulacji płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) jest silnym mitogenem komórek tkanki łącznej. Produkowany przez komórki śródbłonkowe, komórki mięśni gładkich, makrofagi i megakariocyty jako heterodimer składający się z dwóch łańcuchów A lub B (AB) lub jako homodimer (AA lub BB) jest magazynowany w ziarnistościach płytek i uwalniany w wyniku ich stymulacji. Wywiera działanie na komórki tkanki łącznej, odgrywając znaczną rolę w procesach takich jak gojenie ran i tworzenie ziarniny. Jest silnym czynnikiem powodującym proliferację fibroblastów [92, 93]. Powoduje stymulację syntezy DNA i białek. Powoduje też resorpcję kości poprzez stymulację syntezy prostaglandyn. Posiada właściwości zwiększania syntezy pGE₂ w komórkach kości [94] oraz pGF_{2α} w hodowlach komórek mesangialnych [95]. Udowodniono, że TGF-β powoduje indukcję ekspresji genu dla PDGF-B [96].

Wpływ interleukin (m.in. IL-6 i IL-11) jest znaczny w procesach prowadzących do zaburzeń mineralizacji tkanki kostnej, w tym w osteoporozie. Powstawanie osteoklastów z ich komórek progenitorowych zależne jest od osteoblastów podścieliska, które są głównym źródłem cytokin mających wpływ na osteoklastogenezę (IL-6 i IL-11). One z kolei są regulowane przez sterydy płciowe [97]. IL-1 wpływa na resorpcję kości poprzez stymulację proliferacji prekursorów osteoklastów i ich różnicowania w osteoklasty [98, 99].

Cytokiny szpiku kostnego

Dojrzewanie i uwalnianie do krążenia komórek szpiku jest regulowane przez czynniki wzrostu i cytokiny. Należą do nich HGF (hemopoietic growth factor), G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL1, IL2, IL3, IL13, stem cell factor (SCF), trombopoetyna i erytropoetyna. Z wytwarzanych miejscowo w szpiku cytokin GM-CSF jest wytwarzana głównie przez komórki zrzębu, ale również przez limfocyty i komórki śródbłonna. SCF jest cytokiną wielozadaniową. Jej główną funkcją jest pobudzanie komórek pnia (stem cells) do różnicowania się. Niezależnie od wymienionych cytokin inne interleukiny jak IL6, TNF- α i IL8 mogą w sposób krzyżowo-reaktywny pobudzać hemopoezę. Wpływają one głównie na kontakt między poszczególnymi populacjami leukocytów. Wymienione cytokiny wpływają na proces gojenia zarówno ran tkanek miękkich jak i w szczególności złamań kości i mogą prowadzić do pobudzenia populacji komórkowych w regionalnych węzłach chłonnych [¹⁰⁰, ¹⁰¹].

Zakrzepica żylna

Zakrzepica żylna jest częstym powikłaniem występującym u chorych po urazach mechanicznych kończyn. Zakrzepy, ograniczając mechanicznie głębokość kontaminacji bakteryjnej tkanek miękkich, zapobiegają penetracji obcego antygeny do ustroju. Z drugiej strony są one przyczyną zastoju żylnego i obrzęku oraz wielu niekorzystnych następstw patofizjologicznych związanych z przewlekłym nadciśnieniem żylnym [¹⁰²]. Obrzęk pochodzenia żylnego może być w wielu przypadkach komponentą tzw. obrzęku pourazowego.

W obrębie ściany objętego zakrzepicą naczynia dochodzi do powstania pełnoobjawowego procesu zapalnego. Wakefield i wsp [¹⁰³] badając skład komórkowy i ekspresję cytokin w ścianie naczynia żylnego w doświadczalnym modelu zakrzepicy żylny wykazali rozpoczynające się już w godzinę po wystąpieniu zakrzepu naciekanie ściany przez granulocyty obojętnochłonne z następową chemotaksją w 3-6 dobie makrofagów, limfocytów i fibroblastów oraz jednoczesowy statystycznie znamieny wzrost ekspresji cytokin (TNF, ENA-78, MIP-1 α , IL-6 i MCP-1). Pappas i wsp. [¹⁰⁴] stwierdzili zwiększoną ekspresję TGF- β i zwiększoną ilość komórek tucznych i makrofagów w preparatach skóry pobranych od pacjentów z przewlekłą niewydolnością żylną, wnioskując na tej podstawie, że w patomechanizmie powstawania zmian w przewlekłej niewydolności żylny komórki te odgrywają decydującą rolę poprzez wydzielane przez nie czynniki, m.in. TGF. Lagattolla i

wsp. [105] badając stężenia czynników wzrostu w obrębie owrzodzeń troficznych o etiologii żylniej, stwierdzili statystycznie znamienne zwiększenie stężenia TGF-β1, bFGF i aktywatora plazminogenu typu urokinazy w porównaniu ze skórą zdrową.

Odruchowa dystrofia współczulna (algodystrofia, Zespół Sudecka)

Zespół objawów dystroficznych kości i tkanek miękkich występujących u pacjentów po takich urazach kończyn jak: złamania lub rzadziej zwichnięcia, oparzenia, stłuczenia czy uszkodzenia obwodowego układu nerwowego jako pierwszy opisał P. Sudeck [106]. Występowanie tej jednostki chorobowej wiąże się z nie w pełni poznanym, pourazowym procesem (rzekomo)zapalnym toczącym się w tkankach ulegających różnego typu urazom [107, 108, 109].

W Zespole Sudecka (ZS), zwłaszcza w jego pierwszym okresie, najbardziej stałym objawem jest ból. Wraz z postępującymi zaburzeniami ukrwienia dochodzi do występowania obszarów niedoczulicy (u 69%) i przeczulicy (75%), drżenia mięśniowego (49%) i zaburzeń koordynacji ruchowej (43%) oraz rzadziej występujących ruchów mimowolnych, objawów pseudoporażeńnych i nadmiernego pocenia skóry. Charakterystycznym obrazem w tym zespole chorobowym jest niewspółmiernie wysoki w stosunku do urazu, narastający, piekący ból bez wyraźnego umiejscowienia, napięta w wyniku występującego obrzęku, gładka, błyszcząca i często wilgotna skóra z charakterystycznymi przebarwieniami. W pierwszym okresie wskutek przekrwienia nadmiernie ucieplona i zaczerwieniona, w późniejszym sinoczerwona aż wreszcie blada i zimna, ze zmianami troficznymi w obrębie skóry i dystroficznymi tkanek miękkich głębiej położonych^[110]. Z punktu widzenia objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych wyróżnia się trzy okresy ZS [111, 112]:

Okres I - zwany też „przekrwiennym” lub „ciepłym”. Jego objawy związane są ze zmianami naczynioruchowymi dotyczącymi małych naczyń żylnych i włosowatych, prowadzącymi do biernego przekrwienia tkanek. Zaburzenia ukrwienia są powodem występowania silnych dolegliwości bólowych dotyczących całej kończyny, zmian dystroficznych tkanek miękkich, nasilenia obrzęków i w znacznym stopniu ograniczenia ruchów w stawach. Okres ten z reguły trwa około 3 miesięcy. **Okres II** - Zaczyna się przeważnie 3 miesiące po wystąpieniu dolegliwości bólowych i trwa od 3 do 6 miesięcy. Postępujące przekrwienie bierne jest powodem występowania sinoczerwonego zabarwienia skóry. Utrzymują się i narastają: ból,

ograniczenie ruchomości, zmiany dystroficzne tkanek miękkich. Przewlekające się na przestrzeni tygodni zaburzenia naczynioruchowe są powodem nadmiernej aktywacji miejscowych procesów prowadzących do resorpcji kości, co radiologicznie objawia się plamkową atrofią kości. „Plamisty zanik kości” jest najbardziej charakterystycznym objawem radiologicznym tego stadium Zespołu Sudecka. **Okres III** - Na przestrzeni długiego czasu niedokrwienia dochodzi do zmian w obrębie naczyń tętnicznych, czego powodem jest zmniejszenie ucieplenia kończyny (z tej przyczyny okres ten zwany jest „zimnym” lub „niedokrwinnym”) oraz postępujące objawy dystrofii kości i tkanek miękkich prowadzące do znacznego upośledzenia lub całkowitej utraty czynności kończyny. Dolegliwości bólowe rozprzestrzeniają się na obszar całej kończyny. Dochodzi do znacznego zeszywnienia stawów, zaś przykurcze ścięgien zginaczy mogą powodować ich podwichnięcia. Badaniem rentgenowskim stwierdza się zaawansowane zmiany o typie „osteoporozy z nieużywnia”.

Patogeneza występujących zaburzeń w odruchowej dystrofii współczulnej nie jest w pełni poznana. Istnieje wiele koncepcji na temat jej powstawania: mechaniczna, naczynioruchowa, hormonalna, z których każda przypisuje innemu czynnikowi kluczową rolę w zapoczątkowaniu występujących w niej zaburzeń. Ostatnie doniesienia sugerują znamienne rolę substancji takich jak prostaglandyny, bradykinina i wolne rodniki uwalnianych w wyniku uszkodzenia tkanki [¹¹³]. Czynniki te, uwalniane w miejscu urazu, mają wywierać swoje silne działanie na naczynia krwionośne, doprowadzając do znacznego stopnia zaburzeń ukrwienia. Nadmiernie wyrażona ich aktywność w miejscu urazu związana z nadmiernym ich uwalnianiem, czy też raczej miejscowymi zaburzeniami ich hamowania, doprowadza do przedłużającego się w czasie działania naczynioskurczowego i w konsekwencji do przewlekłego zaburzenia ukrwienia tkanek [¹¹⁴]. Dużą rolę w patomechanizmie Zespołu Sudecka przypisuje się zwiększonej aktywacji współczulnego układu nerwowego, który aktywowany przez uwalniane tkankowe substancje czynne powoduje wtórną aktywację ich uwalniania, tworząc specyficzne „błędne koło”.

Rola układu nerwowego w przebiegu miejscowego procesu zapalnego

Obwodowy układ nerwowy działając za pomocą uwalnianych neuropeptydów poza swą funkcją przekazywania bodźców do ośrodkowego układu nerwowego spełnia też funkcję efektorową w procesach zapalnych i regeneracyjnych uszkodzonych tkanek. Już na początku stulecia zaobserwowano, że stymulacja aferentnych włókien nerwowych prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych i zwiększenia przepuszczalności ich ścian [¹¹⁵].

Uwalniane wskutek pobudzenia antydromowego neuropeptydy zlokalizowane w nocyceptywnych zakończeniach aferentnych włókien nerwowych powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych i wzrost ich przepuszczalności, prowadząc do powstania miejscowego procesu zapalnego i obrzęku (zapalenie neurogenne) [116]. Ich działanie nie ogranicza się jedynie do miejsca zadziałania bodźca pierwotnego, lecz występuje w całym otaczającym go obszarze wskazując na istnienie odruchu aksonalnego - impulsy przenoszone są nie tylko dośrodkowo, lecz także obwodowo do niestymulowanych zakończeń nerwowych powodując wydzielanie przez nie neuropeptydów [117]. Doprowadziło do wysnucia wniosku, że neuropeptydy stanowią rodzaj mediatora scalającego układ nerwowy z układem odpornościowym. Za tą hipotezą przemawiają: bezpośrednie peptydergiczne unerwienie pierwotnych i wtórnych narządów limfatycznych, bliskość anatomiczna pomiędzy zakończeniami włókien nerwowych i komórek układu odpornościowego i występowanie specyficznych receptorów dla neuropeptydów na komórkach odpornościowych.

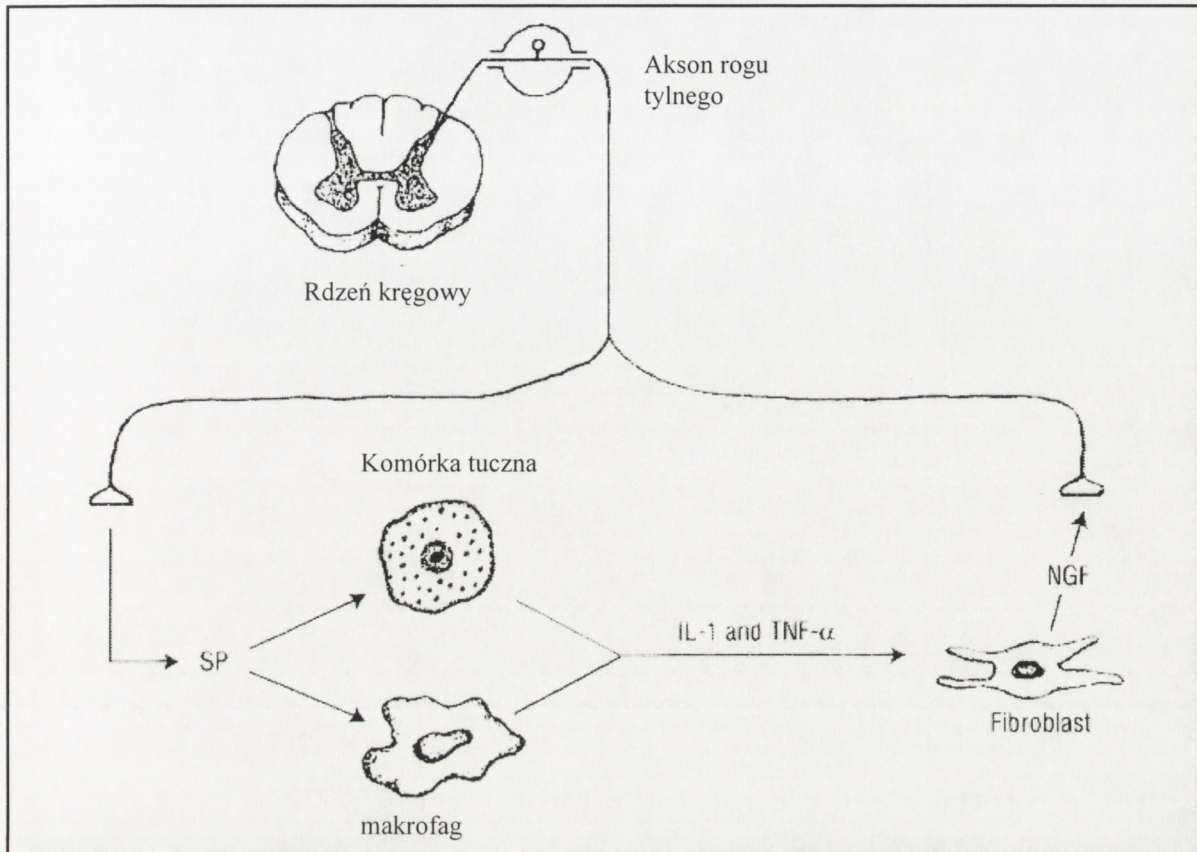
Wiele czynników uwalnianych z uszkodzonych komórek w miejscu urazu powoduje aktywację zakończeń włókien nerwowych. Działanie takie wywierają: uwalniane z uszkodzonych komórek jony potasu, uwalniana z aktywowanych płytek krwi serotonina, powstała z kininogenu osoczonego bradykinina, wydzielany przez keratynocyty i fibroblasty NGF i uwalniane z komórek zapalnych opioidy [118]. Szczególną rolę w regulacji miejscowych procesów zapalnych w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki przypisuje się Substancji P i CGRP.

Substancja P jest 11-aminokwasowym polipeptydem należącym do grupy tachykinin szeroko rozpowszechnionym zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym. Jest ona zlokalizowana w miejscach o szczególnym znaczeniu immunologicznym: w skórze, w przewodzie pokarmowym i w układzie oddechowym [119]. Swoje działanie biologiczne wywiera poprzez stymulację 3 rodzajów receptorów: NK1, NK2 i NK3. Tachykininy, w tym Substancja P, oddziałując bezpośrednio na komórki mięśniówki naczyniowej, powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych, a na komórki śródbłonkowe - wzrost ich przepuszczalności [120, 121]. Substancja P może zapoczątkować zwiększone wynaczynianie płynu w uszkodzonych tkankach [122]. Większość swoich biologicznych działań prozapalnych Substancja P wywiera poprzez receptor NK1. Jego obecność zlokalizowano m.in. w komórkach śródbłonkowych i mięśniówki gładkiej ścian naczyniowych, fibroblastach, keratynocytach i różnych typach krążących komórek odpornościowych biorących udział w procesach zapalnych [123]. Peretti i wsp. [124] stwierdzili, że Substancja P powoduje adhezję granulocytów obojętnochłonnych do ścian naczyń krwionośnych, biorąc tym samym udział w procesie ich wynaczyniania do miejsc toczącego się

procesu zapalnego. Wykazano również bezpośrednie działanie chemotaktyczne wywierane przez Substancję P w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych [125]. Działając na obecne w ranie makrofagi Substancja P wywiera w stosunku do nich działanie chemotaktyczne, aktywuje metabolizm kwasu arachidonowego i ich "wybuch tlenowy" (*oxidative burst*) [126]. Wykazano, że Substancja P stymuluje monocyty do uwalniania IL-1, IL-6 i TNF- α . [127] i szpikowe PMN do uwalniania IL-1 i IL-6 [128] oraz zwiększając syntezę IL-2 i immunoglobulin, głównie IgA w limfocytach [129].

Komórki tuczne są prawdopodobnie najważniejszym komórkowym układem efektorowym odpowiadającym na sygnały przenoszone przez neuropeptydy. Działając na komórki tuczne, Substancja P i inne neuropeptydy (VIP i neuropeptyd Y) powoduje degranulację i uwolnienie substancji czynnych, zapoczątkowując powstanie miejscowego procesu zapalnego [130]. Z kolei uwalniane z komórek tucznych substancje czynne aktywują zakończenia nerwowe, wzmagając miejscowy proces zapalny na drodze odruchu aksonalnego [131]. Efektem działania tego odruchu jest wzmocnienie i przedłużenie miejscowego procesu zapalnego. Z patologicznym, nadmiernie wyrażonym działaniem tego odruchu wiążą się prawdopodobnie niektóre patologiczne procesy zapalne takie jak algodystrofia. Istnieją też doniesienia o wpływie Substancji P na układ chłonny. W stężeniu 1 μ M Substancja P powoduje ponad 6-krotne zwiększenie częstotliwości skurczu ścian naczyń chłonnych oraz prawie 2-krotne zmniejszenie ich średnicy, czego efektem jest przyspieszenie odpływu chłonnego o 43% [132].

CGRP jest 37-aminokwasowym polipeptydem występującym w dwóch formach oznaczanych jako α i β wywierającym działanie poprzez receptory oznaczone jako CGRP₁ i CGRP₂ [133]. Jest ona rozmieszczona w małych neuronach obwodowych częściowo wspólnie z Substancją P. Obwodowe wydzielanie CGRP wywołuje przedłużone zwiększenie przepływu krwi przez naczynia, jednak w przeciwieństwie do Substancji P CGRP nie zwiększa przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych [134, 135]. Fox i wsp. [136] wykazali, że CGRP ma zdolność hamowania proliferacji komórek mononuklearnych.



Ryc.II.1. Hipotetyczny mechanizm działania sprzężenia zwrotnego w procesie zapalnym. Aktywacja bodźców bólowych powoduje uwolnienie Substancji P (SP) z zakończeń nerwowych, co powoduje degranulację komórek tucznych i aktywację makrofagów. Wydzielane przez te komórki cytokiny (IL-1, TNF- α) pobudzają fibroblasty do uwalniania czynnika wzrostu komórek nerwowych (NGF) stymulującego zakończenia nerwowe nocyceptywne w tkankach.

Z: Schaffer M. Beiter T. Becker HD. Hunt TK. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? Archives of Surgery. 133(10):1107-16, 1998

III. MATERIAŁ I METODY

III.I. Część Kliniczna

Obserwacje przeprowadzono u chorych z przewlekłymi obrzękami kończyn dolnych utrzymującymi się powyżej 3 miesięcy po złamaniu, zwknięciu lub znacznym uszkodzeniu tkanek miękkich doznanych w wyniku urazu mechanicznego.

W klasyfikacji chorych ujęto:

1. rodzaj urazu, ze szczególnym uwzględnieniem urazu bezpośredniego i pośredniego,
2. rozpoznanie (zmiany morfologiczne i czynnościowe w kończynie) z uwzględnieniem stopnia uszkodzenia tkanek miękkich, złamań otwartych oraz współistniejących uszkodzeń głównych pni naczyń krwionośnych
3. zastosowane leczenie – w tym zabiegi operacyjne, rodzaj i czas trwania unieruchomienia w opatrunku gipsowym, wspomagające leczenie farmakologiczne i rehabilitacyjne. Zwrócono uwagę na wykonywane w przeszłości zabiegi operacyjne (miejsca poprowadzonych cięć chirurgicznych, ich rozległość, stopień uszkodzenia tkanek miękkich niezbędny do uzyskania dostępu operacyjnego), w czasie których mogło dojść do jatrogennego uszkodzenia naczyń chłonnych.
4. choroby współistniejące - w tym metaboliczne (cukrzyca) i dotyczące krążenia obwodowego,
5. miejscowe powikłania związane z urazem i z zastosowanym leczeniem:
 - ropienie tkanek miękkich w miejscu urazu, ropienie rany pooperacyjnej,
 - zapalenie kości (*osteomyelitis*)
 - zakrzepowe zapalenie żył
 - odruchowa algodystrofia współczulna (Zespół Sudecka)

III.I.1. Ocena stanu klinicznego:

1. umiejscowienie i czas trwania obrzęku,
2. miejscowy stan skóry,

3. pomiary obwodów obu kończyn dolnych na określonych poziomach,
4. napięcie skóry i tkanki podskórnej przy użyciu tonometru mechanicznego (tonometria tkankowa),
5. pomiary temperatury powierzchni skóry,
6. drenaż chłonny kończyny (limfoscyntygrafia - Lsg)
7. drenaż żylny kończyny za pomocą badania USG - Dopplerowskiego
8. badania densytometryczne tkanki kostnej.

III.1.2. Zastosowane metody diagnostyczne i pomiarowe

III.1.2a Rozwój obrzęku i jego umiejscowienie

Za kryterium występowania przewlekłego obrzęku pourazowego przyjęto utrzymywanie się ciastowatego obrzęku ponad 3 miesiące po urazie mechanicznym dotyczącym kończyny dolnej. Za obrzęk ciastowaty (*pitting edema*) przyjmowano utrzymywanie się przez minimum 30 sekund zagłębienia w tkankach miękkich po uciśnięciu kończyny palcem z następowym wypełnianiem się miejsca uciśnięcia i zanikiem zagłębienia. Rozległość obrzęku określano jako obrzęk obejmujący:

1. tylko stopę,
2. stopę i podudzie,
3. bądź też obejmujący całą kończynę z udem łącznie.

III.1.2b Miejscowy stan skóry

Miejscowy stan skóry określano zwracając szczególną uwagę na występujące blizny pourazowe i pooperacyjne, jak również oceniając zabarwienie i ucieplenie skóry oraz stan jej przydatków (włosów i paznokci).

III.1.2c Pomiar obwodów kończyn dolnych

Pomiary obwodów kończyny wykonywano w swobodnym ułożeniu chorego na grzbiecie po rozluźnieniu mięśni przy użyciu taśmy mierniczej z dokładnością do 0.5 cm.

Mierzono obwody dla obu kończyn dolnych prostopadle do osi długiej kończyn na poziomach:

- grzbietu stopy - na szczycie łuku stopy,
- w okolicy nadkostkowej - 5 cm powyżej kostki przyśrodkowej,
- na poziomie podudzia - 10 cm poniżej guzowatości piszczeli,
- na poziomie uda - 15 cm powyżej dolnego bieguna rzepki,

Analizie statystycznej poddano różnice obwodów kończyny z obrzękiem pourazowym i kończyny zdrowej mierzonych na analogicznych poziomach (Ryc.III.1).

III.1.2d Pomiary temperatury powierzchni skóry

Pomiary temperatury powierzchni skóry wykonywano przy użyciu czujnika elektronicznego (Mon-a-therm model 4070, Mallinckrodt Medical Inc, St.Louis, USA) z dokładnością pomiaru do 0.1°C. Pomiary wykonywano na przednio-przyśrodkowej powierzchni goleni 5 cm powyżej kostki przyśrodkowej i na przyśrodkowej powierzchni łydki na obu kończynach równolegle. Analizie statystycznej poddano różnice temperatur mierzonych między kończyną z obrzękiem pourazowym i kończyną zdrową na analogicznych poziomach (Ryc.III.2).

III.1.2e Tonometria tkankowa

Napięcie tkanek badano przy użyciu tonometru mechanicznego (Compac, Genewa, Szwajcaria). Pomiary wykonywano na szczycie łydek obu kończyn przy ułożeniu chorego na brzuchu ze stopami swobodnie zwisającymi poza obręb leżanki przy użyciu ciężarków o łącznej masie 40, 110 i 180 g po ustabilizowaniu się zagłębienia tonometru w tkance (zwykle po 1 min). Uzyskane wyniki porównywano z wynikami uzyskanymi z kontralateralnej kończyny oceniając indeks tonometryczny (I_T) zdefiniowany jako iloraz wyniku uzyskanego dla kończyny z obrzękiem i kończyny kontralateralnej ($I_T = E_T / K_T$, gdzie E - kończyna z obrzękiem, K - kończyna kontralateralna) (Ryc.III.3).

III.1.2f Limfoscyntygrafia

Limfoscyntygrafię wykonywano przy użyciu gammakamery (Orbiter ZLC 750, Siemens, Niemcy) po podskórnym wstrzyknięciu w pierwszą przestrzeń międzypalcową ^{99m}Tc -Nanocolu (3 mCi). Skany wykonywano na poziomie podudzi, ud oraz pachwin 30 min po wstrzyknięciu znacznika w ułożeniu chorego na grzbiecie (skany AP). Oceniano zachowanie przepływu znacznika naczyniami chłonnymi oraz ewentualnie występujący zastój i wynaczynianie znacznika świadczące o przerwaniu ciągłości naczyń chłonnych. Porównywano odpływ znacznika w obu kończynach na tych samych poziomach przyjmując, że stopień „zaczernienia” jest proporcjonalny do wypełnienia go znacznikiem, a więc szybkości przepływu chłonki w naczyniu, oraz stopień gromadzenia się znacznika w pachwinowych węzłach chłonnych. Analizowano również gromadzenie się znacznika w pęcherzu moczowym (uwidocznionego na wszystkich skanach pachwin) oraz w wątrobie (możliwe do obserwacji na części skanów pachwin) (Ryc.III.4).

III.1.2g Badania USG-Dopplerowskie

Badania przeprowadzono przy użyciu aparatu Acuson (Acuson Corp., Mountain View, California, USA). Obserwowano przepływ w żyłach: udowej (*v.femoralis*), udowej powierzchownej (*v.saphena magna*), podkolanowej (*v.poplitea*), żyłach głębokich podudzia - piszczelowej przedniej i tylnej (*v.tibialis anterior et posterior*) i strzałkowej (*v.peronea*). Obserwowano zachowanie przepływu, poddawanie się naczyń uciskowi sondy oraz przepływ fazowy i wsteczny (obecność fali zwrotnej przy próbie Valsalvy), świadczący o zaburzeniach funkcji zastawek żylnych.

III.1.2h Badania densytometryczne

Badania przeprowadzono w przypadku klinicznie podejrzewanych zmian o typie algodystrofii u pacjentów po urazach mechanicznych kończyn dolnych przy użyciu aparatu Lunar Expert - XL (Lunar Corp., USA). Wykonywano skany obu stóp na tych samych poziomach obejmujących 1/3 dalszą podudzia. Wyniki uzyskane ze zdrowej kończyny służyły jako kontrole. Wykonane skany poddawano analizie przy użyciu specjalistycznego oprogramowania komputerowego dającego w wyniku wartości liczbowe mineralnej gęstości kości (BMD - *Bone Mineral Density*) w g/cm^2 . Analizie poddano

stopień odwapnienia uszkodzonej mechanicznie kończyny określając iloraz BMD dla nogi po urazie i BMD dla kończyny kontralateralnej (zdrowej).

III.II. Część Doświadczalna

III.II.1. Schemat planowanych obserwacji

Przeprowadzono doświadczenia umożliwiające zbadanie:

1. wpływu na struktury anatomiczne układu chłonnego (naczynia i węzły chłonne) elementów morfotycznych krwi obwodowej podanych podskórnie i bezpośrednio do przedwężłowego naczynia chłonnego,
2. wpływu na struktury anatomiczne układu chłonnego (naczynia i węzły chłonne) podanych podskórnie komórek szpiku kostnego,
3. zmian morfologicznych w skórze i tkance podskórnej wywołanych przez podaną podskórnie krew żylną i komórki szpiku kostnego,
4. wpływu podskórnie wstrzykniętej krwi żyłnej na skład morfotyczny chłonki przedwężłowej,
5. dynamiki odprowadzania przez układ chłonny wstrzykniętych podskórnie poszczególnych elementów morfotycznych krwi obwodowej,
6. wpływu komórek szpiku na autologiczne limfocyty węzłów chłonnych w hodowlach,
7. wpływu przewlekłego zakażenia szczepami bakterii zasiedlającymi skórę na strukturę naczyń i węzłów chłonnych,
8. stopnia pobudzania limfocytów węzła chłonnego przez komórki bakterii szczepów zasiedlających skórę.

III.II.2. Podział grup doświadczalnych

III.II.2a Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych psach mieszańcach o wadze 20-30 kg w dożylnym znieczuleniu ogólnym pentobarbitem 30 mg/kg mc (Vetbutal, Biowet Puławy Sp.z.o.o., Polska). Przed eksperymentem zwierzęta były trzymane w 12 godzinny reżimie dnia/nocy z dostępem do standardowej karmy i wody *ad libitum*. Po zakończonych eksperymentach zwierzęta usypiano dożylnym podaniem letalnej dawki Vetbutalu.

Na badania wyraziła zgodę Komisja Etyczna Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

Doświadczenia przeprowadzono w następujących grupach:

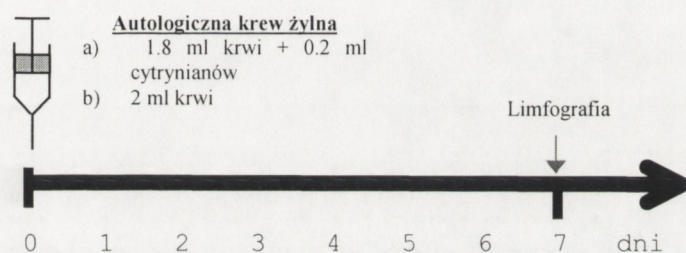
1. a). Badanie wpływu bezpośredniego wstrzyknięcia do naczynia chłonnego krwi żyłnej z dodatkiem cytrynianów na struktury anatomiczne naczyń chłonnych i węzła chłonnego kończyny.
1. b). Badanie wpływu bezpośredniego wstrzyknięcia do naczynia chłonnego krwi żyłnej bez dodatku cytrynianów na struktury anatomiczne naczyń chłonnych i węzła chłonnego kończyny.
2. Badanie wpływu podskórnego wstrzyknięcia krwi żyłnej na skład morfotyczny chłonki przedwęzłowej.
3. Badanie dynamiki transportu układem naczyń chłonnych podanych podskórnice: a) erytrocytów, b) leukocytów i c) płytek.
4. Badanie zmian morfologicznych w skórze i tkance podskórnej zachodzących pod wpływem podskórnego podania autogennych a). komórek krwi i b). szpiku kostnego.
5. Badanie *in vitro* wpływu autogennych komórek a). leukocytów krwi obwodowej i b). szpiku kostnego na aktywację komórek węzła chłonnego.
6. Badanie wpływu przewlekłego podawania podskórnice szczepów bakterii zasiedlających skórę łapy psa na struktury anatomiczne naczyń i węzłów chłonnych ocenianych metodą limfograficzną i immunohistochemiczną.
7. Badanie pobudzenia *in vitro* komórek węzła chłonnego atenuowanymi szczepami bakterii zasiedlających skórę łapy psa w hodowli limfocytów.

III.II.2.1. Badanie wpływu bezpośredniego wstrzyknięcia krwi żyłnej do naczynia chłonnego na struktury anatomiczne naczyń chłonnych i węzła chłonnego kończyny.

Obserwacje przeprowadzono dokonując bezpośredniego wstrzyknięcia do skaniulowanego naczynia chłonnego w okolicy grzbietu stopy:

- a). krwi żyłnej (1.8 ml) z dodatkiem cytrynianów (0.2 ml) 4 doświadczenia
- b). krwi żyłnej (2 ml) bez antykoagulantów. 4 doświadczenia

Po 7 dobach wykonywano limfografie bezpośrednio kaniulując naczynia chłonne oraz pobierano preparaty naczyń chłonnych z miejsc wstrzyknięcia, pęczka naczyniowego żyły



Protokół doświadczenia III.II.2.1

Wpływ bezpośredniego wstrzyknięcia autologicznej krwi żyłnej na drenaż chłonny kończyny

odstopowej z towarzyszącymi jej naczyniami chłonnymi i podkolanowych węzłów chłonnych, z których wykonano preparaty histologiczne barwione techniką HE.

III.II.2.1i Technika kaniulacji naczynia chłonnego tylnej łapy psa

Z cięcia o długości ok. 4 cm na grzbietowej powierzchni stopy prostopadle do jej osi długiej odsłaniano żyłę odstopową. Po podskórnym podaniu jałowego wodnego roztworu błękitu patentowego (2.5% roztwór wodny Patent Blue, Therapex, Montreal, Kanada) w przestrzeniach między pazurami 2-3, 3-4 i 4-5 i delikatnym uciskaniu łap wybarwiano naczynia chłonne towarzyszące żyłę. Kaniulowano kaniulami wykonanymi z drenu polietylenowego (800/110/140, Portex, Hythe, Kent, Wielka Brytania) o łącznej długości około 20 cm zakończonymi końcówkami o średnicy zewnętrznej 0.3 - 0.5 mm i umocowywano do okolicznych tkanek miękkich dwoma jałowymi szwami chirurgicznymi.

III.II.2.1ii Technika wykonania limfografii bezpośredniej

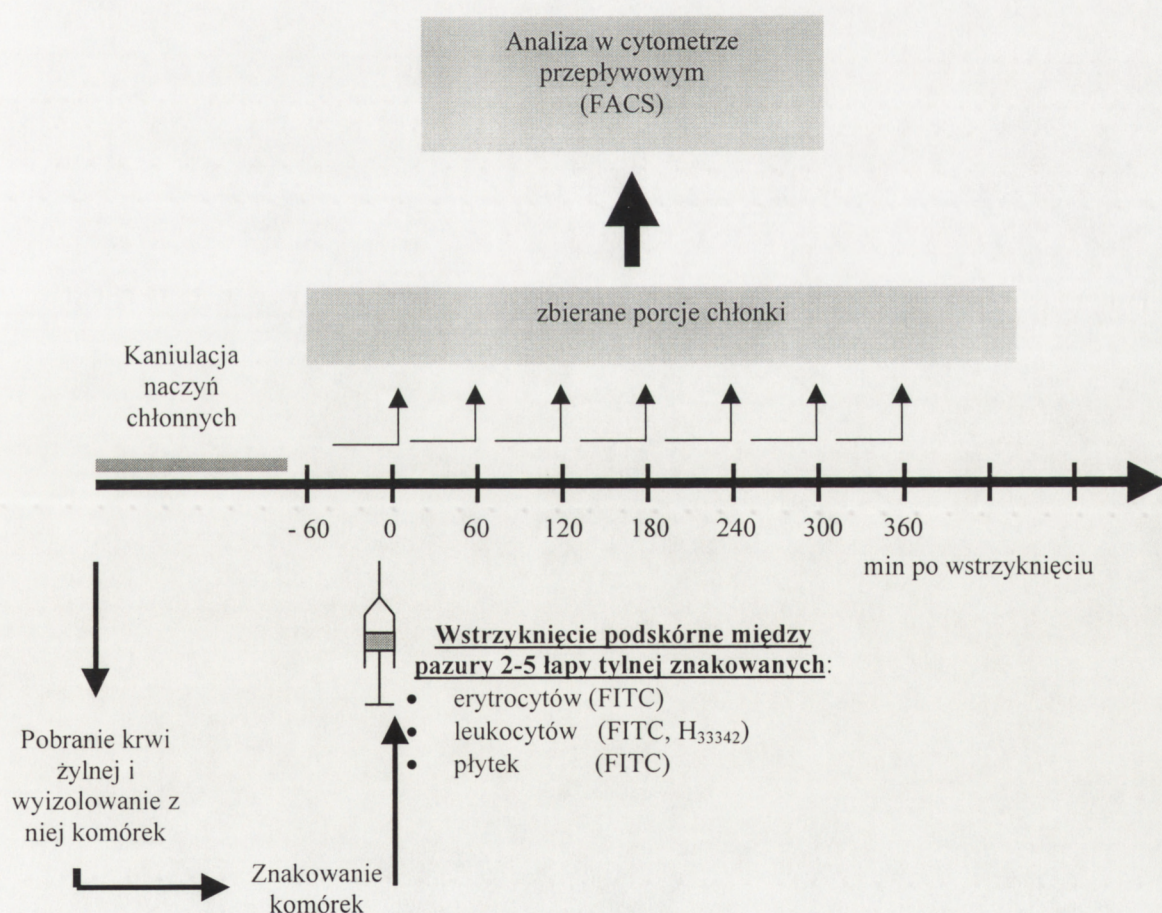
Cięcia skórne o długości ok. 4 cm prowadzono prostopadle do osi długiej łąpy. Naczynia chłonne wybarwiano błękitem patentowym, po czym wybierano i kaniulowano jedno z nich. Psa przenoszono na stół aparatu rentgenowskiego (Siemens, Niemcy) i w ułożeniu na boku wykonywano po 3 ekspozycje (80mA, 40kV, 0.05s) po bezpośrednim wstrzyknięciu do przedwężłowego naczynia chłonnego 0.5 ml Lipiodolu (Lipiodol Ultra Fluide, Laboratoires Guerbet, Francja). Ekspozycje wykonywano z odległości 1 m od lampy rentgenowskiej używając filmu XR-1 (Foton, Warszawa) z ekranem ziem rzadkich (Quanta Rapid 1000, DuPont, Francja) poddawanych obróbce w ciemni automatycznej.

III.II.2.1iii Technika pobierania skóry, naczyń chłonnych przedwężłowych i podkolanowych węzłów chłonnych do badań histopatologicznych

Do badań histopatologicznych pobierano wycinki skóry pełnej grubości o wymiarach 3x5 mm z okolic grzbietu stopy. Z cięcia skóry o długości ok.4 cm na bocznej powierzchni 1/3 dalszej podudzia docierano do żyły odstopowej. Naczynia chłonne wybarwiano wstrzyknięciem podskórnym w przestrzenie międzypazururowe błękitem patentowego, a następnie wypreparowywano je wraz z towarzyszącą żyłą pobierając fragmenty o długości ok. 0.5 cm i utrwalano w formalinie. Następnie z cięcia o długości około 5 cm otwierano dół podkolanowy bezpośrednio nad węzłem chłonnym. Po wypreparowaniu węzła pobierano go w całości. Pobrane tkanki utrwalano w 10% roztworze buforowanej formaliny.

III.II.2.2. Badanie wpływu podskórnego wstrzyknięcia krwi żyłnej na skład morfotyczny chłonki przedwężłowej.

Przeprowadzono 5 doświadczeń zbierając chłonkę, (wg techniki kaniulacji naczynia chłonnego opisanej powyżej) po podskórnym wstrzyknięciu po 1.0 ml autologicznej krwi żyłnej w przestrzenie między pazury tylnych łap, w porcjach godzinnych rozpoczynając 1 godzinę przed i kontynuując przez 10 godzin po wstrzyknięciu. W czasie zbierania chłonki pies umieszczony był w stanowisku badawczym z kończynami zwisającymi swobodnie, z wymuszeniem biernego ruchu kończynami tylnymi w kierunku przód – tył z częstotliwością



Protokół doświadczenia III.II.2.3

Badanie dynamiki transportu układem naczyń chłonnych podanych podskórnie erytrocytów, leukocytów i płytek.

40/min i amplitudą ruchu 20 cm w urządzeniu do poruszania kończyny. W kolejnych porcjach chłonki oznaczano liczbę erytrocytów i leukocytów.

III.II.2.3. Badanie dynamiki transportu podanych podskórnice erytrocytów, leukocytów i płytek układem naczyń chłonnych.

Wyizolowywano z autologicznej krwi żyłnej (5ml) poszczególne populacje komórek: a) erytrocyty (5 doświadczeń), b) leukocyty (b1 - 4 doświadczenia), c) płytki krwi (5 doświadczeń). Izolowane komórki erytrocyty, leukocyty i płytki znakowano FITC. Dodatkowo leukocyty były znakowane w osobnym doświadczeniu barwnikiem przyżyciowym H₃₃₃₄₂ (4 doświadczenia).

Następnie komórki wstrzykiwano podskórnice w objętości 1.5 ml w trzy przestrzenie między pazury 2-3, 3-4 i 4-5 tylnych łap psów w ilościach rzędu 10⁹/ml erytrocytów, 10⁷/ml leukocytów i 10⁶ płytek krwi. Chłonkę zbierano w porcjach co godzinę począwszy od 1 godziny przed wstrzyknięciem do 6 godzin po wstrzyknięciu znakowanych komórek. Oznaczano liczbę znakowanych komórek w poszczególnych porcjach chłonki poprzez pomiar intensywności świecenia komórek w cytometrze przepływowym (FACS). Uzyskane wyniki porównywano określając odsetek wstrzykniętych komórek drenowanych układem chłonnym w czasie.

III.II.2.3i Technika znakowania elementów morfotycznych krwi znacznikami fluorescencyjnymi

Krew żylną (5 ml) pobierano z żyły odpromieniowej na heparynę (10 IU/ml, Novo Nordisk AS, Bagswærd, Dania), oznaczano stężenie erytrocytów w kamerze Bürkera, a następnie izolowano komórki met. „kożuszka” poprzez wirowanie przy 300g przez 15 min. Zawiesinę leukocytów zbierano, a trombocyty w nadsączu odrzucano. Z pozostałych 2/3 dolnych peletki erytrocytów oraz zebranej zawiesiny leukocytów liczono osobno liczbę erytrocytów i leukocytów przy użyciu kamery Bürkera.

Erytrocyty dzielono na 2 próbki po ok. 5x10⁹ każda. Każdą z nich odwirowywano 200g przez 10 min i zawieszano w 45 ml PBS (Biomed, Lublin) z dodatkiem 2% autologicznej, inaktywowanej (57°C, 30 min) surowicy psa i dodawano 5 ml FITC (2.5 mg; 50µg/10⁸ erytrocytów, Sigma, St.Louis, Missouri, USA). Zawiesinę umieszczano w cieplarni w 37°C na 20 min w zaciemnieniu. Następnie zawiesinę dzielono na 2 równe próbki, do

każdej dodawano po 25 ml zimnego (4°C) PBS'u z dodatkiem 2% surowicy + HEPES (2.5ml, 25µg, Gibco, Life Technologies, Paisley, Wielka Brytania) i wirowano przy 200g przez 10 min. Po odpipetowaniu i usuwaniem supernatantu peletki zawieszano w 2 ml PBS+2% surowicy + HEPES, nawarstwiano na 5 ml surowicy psa i odwirowywano przy 250g przez 10 min. Zawiesinę erytrocytów 3-krotnie płukano w PBS+2%surowicy +HEPES (20 ml / próbkę) wirując przy 200g przez 10 min z usuwaniem supernatantu. Po trzecim wirowaniu liczono stężenie świecących erytrocytów w kamerze Bürkera w mikroskopie fluorescencyjnym.

Leukocyty (znakowanie FITC) Krew żylną (4 ml) pobierano z żyły odpromieniowej psa na heparynę (10 IU/ml, Novo Nordisk AS, Bagswærd, Dania) i mieszano ją w stężeniu 1:1 z 0.9% NaCl. Następnie odwirowywano przy 250g przez 30 min na gradiencie Percollu (Pharmacia, Uppsala, Szwecja) o kolejnych stężeniach 67, 55, 50, i 40% uzyskując rozdzielanie poszczególnych populacji komórek krwi obwodowej (licząc kolejno od 'góry' – pierścienie płytek, limfocytów, granulocytów i na dole peletkę erytrocytów). Odpipetowywano populacje limfocytów i granulocytów.

Komórki zawieszano w 1.8 ml PBS z 2% surowicy, dodawano 0.2 ml FITC i umieszczano w cieplarni w zaciemnieniu w 37°C na 20 min. Następnie dodawano 2 ml zimnego (+4°C) PBS z 2% surowicy, nawarstwiano na 2 ml surowicy i odwirowywano przy 250g przez 10 min. Supernatant odrzucano, peletkę płukano 2-krotnie przez zawieszanie jej w 2 ml PBSu z 2% surowicy i odwirowanie przy 200g przez 10 min i zawieszano w 3.0 ml surowicy, którą wstrzykiwano podskórnie między pazury 2-5 obu tylnych łap (po 1.5 ml/łapę).

Leukocyty (znakowanie H₃₃₃₄₂). pobrane przy użyciu met. „kożuska” płukano trzykrotnie w pożywce RPMI wirując przez 10 min przy 250g. Następnie lizowano pozostałe erytrocyty poprzez dodanie do peletki 3 ml H₂O destylowanej i po 30 sek - 1 ml 3.6% NaCl (+EDTA). Uzyskane leukocyty liczono w kamerze Bürkera i barwiono w stężeniu 10⁷/ml w 1 ml RPMI (Biomed, Lublin) z dodatkiem 5µl H₃₃₃₄₂ (1mM, Hoechst). Zawiesinę leukocytów zawieszano w 1 ml autologicznej surowicy.

Płytki krwi. Pobierano 10 ml autologicznej krwi żyłnej do probówki Vacutainer (Becton Dickinson, Wielka Brytania) z EDTA, odwirowywano przy 140g przez 10 min i zbierano bogatopłytkowe osocze, które następnie wirowano przez 10 min przy 360g. Supernatant odrzucano, zaś osad 2-krotnie płukano w 5 ml D-PBS z dodatkiem 2% surowicy i 0.3% EDTA wirując przy 200g przez 10 min.

Peletkę zawieszano w 3.6 ml PBS i 0.4 ml FITC i inkubowano w 37°C w zaciemnieniu. Po zakończonej inkubacji dodawano zimny (+4°C) PBS w objętości 2-krotnie większej niż objętość próbki. Odwirowywano 200g przez 10 min i osad płytek przesączało przez gazę młynarską. Przygotowane płytki zawieszano w 1.5 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej. Stężenia płytek w krwi żyłnej bezpośrednio po jej pobraniu, jak i po znakowaniu FITC oraz bezpośrednio przed przygotowaniem zawiesiny przygotowanej do wstrzyknięcia określano przy użyciu aparatu automatycznego (Cell-Dyn 1600, Bio Merieux, Francja) i zliczając próbki kontrolne w cytometrze przepływowym (FACS). Próbki chłonki uzyskanej z kończyny analizowano przy użyciu FACS'u.

III.II.2.3ii Oznaczanie odsetka komórek znakowanych FITC i H_{33342} w chłonce

Z uzyskanych próbek chłonki odwirowywano komórki, inkubowano je przez 30 min w temp. +4°C i płukano dwukrotnie w PBS z dodatkiem 2% DFCS. Osad komórek zawieszano w 0.5ml 1% paraformaldehydu, dokładnie mieszano i przechowywano w ciemnym miejscu w temp. +4°C do momentu badania w cytometrze przepływowym.

Procentową zawartość komórek wybarwionych fluoresceiną oceniano w cytometrze przepływowym FACStar (Becton Dickinson, San Jose, USA) wyposażonym w pojedynczy laser argonowy emitujący światło o długości fali 488 nm oraz filtr dla FITC 530 nm.

Za pomocą programu FACStar^{Plus} zbierano i przechowywano dane z 10000 komórek każdej badanej próbki. Analizę statystyczną danych wykonywano posługując się programem FlowMATE (DAKO Glostrup, Dania) na podstawie histogramów fluorescencji z uwzględnieniem próby kontrolnej.

Leukocyty wyznakowane H₃₃₃₄₂ liczono w kamerze Bürkera w mikroskopie fluorescencyjnym (BH-2, Olympus).

III.II.2.4. Badanie zmian morfologicznych zachodzących w skórze i tkance podskórnej pod wpływem podskórnego podania komórek krwi i szpiku kostnego.

Przeprowadzono 4 doświadczenia wstrzykując 3-krotnie co 24 godziny podskórnie między pazury tylnych łap:

- a) po 10^7 komórek autologicznego szpiku kostnego zawieszonych w 1.0 ml 0.9% NaCl (4 doświadczenia)
- b) po 1.0 ml autologicznej krwi żyłnej (4 doświadczenia)

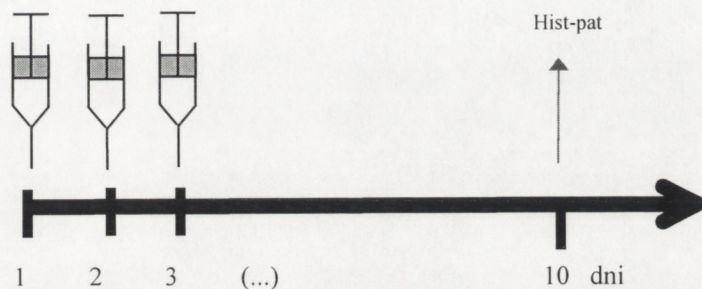
W 7 dobie po ostatnim wstrzyknięciu pobierano do badań histopatologicznych skórę z tkanką podskórną z okolic wstrzyknięcia i podkolanowe węzły chłonne. Z pobranych tkanek wykonywano preparaty barwione HE, oraz preparaty immunohistochemiczne z przeciwciałami monoklonalnymi przeciw:

- CD3 (znakowanie limfocytów T)
- DR (znakowanie komórek dendrytycznych, monocytów i makrofagów)
- Mac3 (znakowanie monocytów i makrofagów)
- CD22 (znakowanie limfocytów B)

III.II.2.4i Technika pobierania szpiku kostnego

Z cięcia skóry o długości około 3 cm w okolicy biodra – nad nasadą bliższą kości

II.2.4.a 10^7 komórek szpiku w 1.0 ml
II.2.4.b 1.0 ml krwi żyłnej



Protokół doświadczenia III.II.2.4a,b

Badanie zmian morfologicznych w skórze i tkance podskórnej zachodzących pod wpływem podskórnego podania komórek krwi i szpiku kostnego.

udowej docierano do szczytu krętarza większego, w którym wykonywano otwór trepanacyjny o średnicy ok. 3 mm. W otwór wprowadzano igłę nr.12, przez którą aspirowano ok. 15 ml szpiku do heparynizowanej strzykawki.

III.II.2.4ii Technika pobierania skóry, tkanki podskórnej i węzłów chłonnych do barwienia HE i immunohistochemicznego

W 7 dobie (licząc od ostatniego wstrzyknięcia) pobierano z miejsc wstrzyknięcia fragmenty skóry wraz z tkanką podskórną oraz fragmenty podkolanowych węzłów chłonnych. Utrwalano je w 10% roztworze buforowanym formaliny oraz metodą mrożenia w temperaturze -70°C . Z fragmentów tkanek utrwalanych w roztworze formaliny wykonywano preparaty barwione standardową techniką HE; z materiału pobranego na mrożenie wykonano preparaty immunohistochemiczne.

III.II.2.4iii Technika znakowania immunohistochemicznego skrawków skóry i tkanki podskórnej oraz węzłów chłonnych

Pobrane tkanki krojono mikrotomem na skrawki o grubości $5\ \mu\text{m}$, które utrwalano przez 10 min w acetonie, a następnie po podsuszeniu blokowano przez 20 min 50%NSS i inkubowano przez 30 min z wybranymi przeciwciałami monoklonalnymi

(CD3, CD22, Mac3 i DR - LSAB2 kit, Dako, Dania). Po zakończeniu inkubacji preparaty płukano dwukrotnie w TBS i inkubowano przez 20 min z drugorzędowym przeciwciałem, które stanowiły biotynylowane immunoglobuliny królika skierowane przeciw immunoglobulinom myszy z dodatkiem 20% NDS, po czym powtórnie dwukrotnie płukano przez 5 min w TBS i po nałożeniu 100 μ l streptowidyny skoniugowanej z fosfatazą alkaliczną inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji dwukrotnie płukano w TBS po 5 min., nakładano substrat AP i inkubowano przez 15 min, po czym powtórnie dwukrotnie płukano w H₂O destylowanej przez 5 min i dobarwiano hematoksyliną przez 60 sek. Preparaty po wypłukaniu i wysuszeniu zamykano w glicerolu.

III.II.2.5. Badanie *in vitro* wpływu leukocytów krwi obwodowej i komórek szpiku kostnego na aktywację komórek węzła chłonnego.

Przeprowadzono 8 doświadczeń zakładając sześciodniowe hodowle mieszane wyizolowanych limfocytów podkolanowych węzłów chłonnych, leukocytów krwi obwodowej i komórek szpiku kostnego pobudzonych populacjami ww komórek blokowanych mitomycyną C (40 μ g w 0.1 ml H₂O do iniekcji, inkubowane w temp. 37°C przez 1 godzinę, Sigma, St.Louis, USA) w stosunku 1:1 i 1:0.5 używając po 10⁷ komórek. Na 18 godzin przed zakończeniem hodowli do każdej z nich dodawano po 25 μ l ³H-tymidyny (metyl-³H tymidyna, 2.37TBq/mmol, 64Ci/mmol, Amersham Life Science Products, Amersham Pharmacia). Po 3 dobach kończono hodowle przy użyciu harwestera (Micro96, Skatron Instr., Norwegia) i po wysuszeniu bibułek oznaczano promieniowanie w liczniku scyntylacyjnym (LS5000TA, Beckman Instr., USA) w czasie 1 min. Kontrole dla każdej z hodowli stanowiły: test autotransformacji oraz stymulowanie PHA 90 μ g/ml i nieblokowanymi populacjami komórek PBM, BMC i LN.

III.II.2.5i Technika pobierania komórek szpiku kostnego, leukocytów krwi obwodowej i limfocytów z węzła chłonnego do hodowli mieszanej

a). Komórki szpiku kostnego. Z pobranego wg metody opisanej powyżej szpiku kostnego z kości udowej izolowano komórki szpiku poprzez wywołanie hemolizy erytrocytów w H₂O destylowanej. Po usunięciu erytrocytów zawiesiny komórek szpiku doprowadzano do stężeń 10⁶ komórek/ml w RPMI+20% DFCS+100μl Fungizonu + 100μl Cefprozylu + 1 ml L-glutaminy + 1 ml HEPES.

b). Leukocyty krwi obwodowej. Pobraną krew żylną rozcieńczano 3-krotnie w 0.9% NaCl i po nawartstwieciu na Limfoprepie wirowano 400g przez 40 min. po czym zbierano obrączkę limfocytów, którą płukano czterokrotnie w RPMI + 5% DFCS przez 10 min kolejno z 450, 400, 350 i 300g. Zawiesiny limfocytów zawieszano w stężeniach 10⁶ komórek / ml w RPMI+20% DFCS+100μl Fungizonu + 100μl Cefprozylu + 1 ml L-glutaminy + 1 ml HEPES.

c). Limfocyty węzła chłonnego. Z pobranych węzłów chłonnych podkolanowych wg techniki podanej powyżej izolowano limfocyty poprzez wyczesywanie jałowymi igłami do iniekcji. Po przesączeniu zawiesiny komórek przez filtr zestawu do dożylnych wlewów kroplowych zawiesinę dwukrotnie płukano w RPMI z dodatkiem 10% DFCS, 100 μl Fungizonu i 1 ml L-glutaminy. Zawiesinę doprowadzano do stężenia 10⁶ komórek / ml zawieszając je w RPMI+20% DFCS+100μl Fungizonu + 100μl Cefprozylu + 1 ml L-glutaminy + 1 ml HEPES.

Żywotność komórek oznaczano barwieniem w 0.25% roztworze błękitu trypanu (Trypan blue). Wszystkie procedury stosowane przy pobieraniu materiału i izolacji komórek wykonywano przy zachowaniu zasad jałowości sterylnymi narzędziami chirurgicznymi, używając sterylnych naczyń i odczynników.

III.II.2.5ii Technika zakładania hodowli mieszanej komórek szpiku kostnego, leukocytów krwi obwodowej i limfocytów węzła chłonnego.

Po wyizolowaniu komórek szpiku, limfocytów krwi obwodowej i węzła chłonnego zakładano sześciodniowe hodowle mieszane określając kolejno stopień stymulacji komórek

szpiku kostnego, leukocytów krwi obwodowej i limfocytów węzła chłonnego przez komórki szpiku kostnego, leukocytów krwi obwodowej i limfocytów węzła chłonnego oraz blokowane mitomycyną C komórki szpiku kostnego, leukocytów krwi obwodowej i limfocytów węzła chłonnego w stężeniu 1:1 i 1:0.5. Kontrole stanowiły testy autotransformacji i stymulacji PHA 90 µg/ml komórek szpiku kostnego, leukocytów krwi obwodowej i limfocytów węzła chłonnego.

Hodowle utrzymywano na płytkach do hodowli (Nunclon, Nalge Nunc International, Dania) w stałej temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Na 18 godzin przed zakończeniem hodowli do każdej z nich dodawano po 25µl ³H-tymidyny (metyl-³H tymidyna, 2.37TBq/mmol, 64Ci/mmol, Amersham Life Science Products, Amersham Pharmacia). Po 3 dobach kończono hodowle przy użyciu harwestera (Micro96, Skatron Instr., Norwegia) i po wysuszeniu bibuły oznaczano promieniowanie w liczniku scyntylicyjnym (LS5000TA, Beckman Instr., USA) w czasie 1 min.

III.II.2.6. Badanie wpływu przewlekłego podawania podskórnie szczepów bakterii zasiedlających skórę łapy psa na struktury anatomiczne naczyń i węzłów chłonnych ocenianych metodą limfograficzną i immunohistochemiczną.

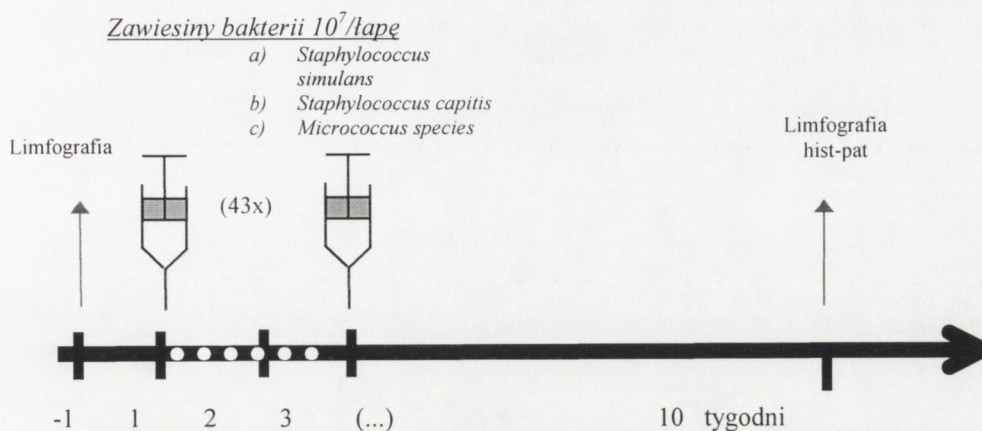
Przeprowadzono 12 doświadczeń wstrzykując codziennie, 5 dni w tygodniu przez 10 tygodni (łącznie po 43 wstrzyknięcia) po 10⁷ żywych komórek zawieszonych w 1.0 ml jałowego roztworu 0.9% NaCl szczepów bakterii saprofitujących na skórze psa: a) *Staphylococcus simulans*, b) *Staphylococcus capitis* i c) *Micrococcus species*, wykonując po 4 doświadczenia z bakteriami z każdego ze szczepów. Tydzień po zakończeniu cyklu wstrzyknięć wykonano limfografie bezpośrednie. Uzyskane wyniki odnoszono do wyników kontrolnych limfografii wykonanych tydzień przed rozpoczęciem cyklu wstrzyknięć. Uzyskane radiogramy wskanowywano i poddawano obróbce komputerowej przy użyciu specjalistycznego oprogramowania (MicroImage, Olympus Optical Co., Niemcy) umożliwiającego dokonanie pomiarów średnicy przedwęzłowych naczyń chłonnych i pól powierzchni podkolanowych węzłów chłonnych. Pomiaru naczyń chłonnych wykonywano zawsze na tych samym poziomach (1/3 dalsza podudzia), co umożliwiło porównanie pomiędzy limfogramami wykonanymi przed i po zakończeniu serii wstrzyknięć bakterii w

każdym z doświadczeń. Do analizy statystycznej liczone sumaryczne pola powierzchni naczyń chłonnych przyjmując, że są one strukturami cylindrycznymi wg wzoru $S=\pi/8*(d_1^2+d_2^2+d_3^2)$, gdzie d_x - średnica naczynia chłonnego, a d_1 , d_2 i d_3 - uwidocznione naczynia chłonne. Analogicznie porównywano pola powierzchni uwidocznionych na limfogramach podkolanowych węzłów chłonnych dla każdego z doświadczeń przed i po serii wstrzyknięć bakterii.

Pobierano skrawki tkanek: skóry i tkanki podskórnej z miejsc wstrzykiwania bakterii oraz żyły odstopowej z towarzyszącymi jej przedwęzłowymi naczyniami chłonnymi i podkolanowe węzły chłonne, które utrwalano w 10% roztworze buforowanej formaliny i zamrażano w -70°C . Ze skrawków utrwalanych w formalinie wykonywano preparaty barwione HE, ze skrawków mrożonych wykonywano preparaty immunohistochemiczne. Dodatkowo przy zachowaniu zasad aseptyki pobierano fragmenty węzłów chłonnych do badań bakteriologicznych.

III.II.2.6i Technika izolowania szczepów zasiedlających skórę psa.

Pobrano od trzech psów wymazy z powierzchni skóry z okolic przestrzeni międzypazurowych obu tylnych łap (6 wymazów) na podłoża transportowe, które posiano na podłoża Schaedlera, Columbia, MacConkeya i Chapmana. Wyhodowane szczepy identyfikowano za pomocą testów biochemicznych Api Staph (Bio Merieux, Francja). Do dalszych doświadczeń wybrano trzy szczepy, które występowały na skórze psów najczęściej: *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis* i *Micrococcus species*. Szczepy te izolowano i namnażano na podłożu Columbia (agar). Hodowle zawieszano w jałowym roztworze soli fizjologicznej do wstrzyknięć w stężeniach $10^7/\text{ml}$ oznaczając gęstość komórek w zawiesinie za pomocą densytometru.



Protokół doświadczenia III.II.2.6

Badanie wpływu przewlekłego podawania podskórnie szczepów bakterii zasiedlających skórę łapy psa na struktury anatomiczne naczyń i węzłów chłonnych ocenianych metodą limfograficzną i immunohistochemiczną.

III.II.2.7. Badanie pobudzenia *in vitro* komórek węzła chłonnego atenuowanymi szczepami bakterii zasiedlających skórę łapy psa metodą hodowli limfocytów.

Przeprowadzono 12 doświadczeń na psach wstrzykując codziennie, 5 dni w tygodniu przez 10 tygodni (łącznie po 43 wstrzyknięcia) po 10^7 komórek w 1.0 ml jałowego roztworu 0.9% NaCl szczepów żywych bakterii wyizolowanych ze skóry psa: a) *Staphylococcus simulans*, b) *Staphylococcus capitis* i c) *Micrococcus species*, wykonując po 4 doświadczenia z bakteriami z każdego ze szczepów. 20-22 dni po ostatnim wstrzyknięciu pobierano z zachowaniem zasad aseptyki podkolanowe węzły chłonne. Z węzłów pobierano wymazy, z których wykonywano posiewy bakteryjne. Z węzłów izolowano również limfocyty, z których zakładano hodowle 6-dniowe z zawiesinami atenuowanych szczepów bakteryjnych. Na 18 godzin przed zakończeniem hodowli do każdej z nich dodawano ^3H -tymidyny. Wyniki określano mierząc promieniowanie próbek w liczniku promieniowania.

Punkt odniesienia stanowiły 72-godzinne hodowle komórek pobranych z węzłów chłonnych stymulowanych PHA, Con A i PWM, do których na 18 godzin przed zakończeniem hodowli dodawano ^3H -tymidyny.

Kontrole stanowiły hodowle (4 doświadczenia- grupa d.) z komórek podkolanowych węzłów chłonnych psów, którym nie wstrzykiwano bakterii.

III.II.2.7i Technika wykonywania posiewów bakteryjnych

W 20-22 dni po ostatnim podskórnym wstrzyknięciu bakterii pobierano podkolanowe węzły chłonne z zachowaniem zasad aseptyki jałowymi narzędziami chirurgicznymi. Z pobranych skrawków węzłów wykonywano homogenaty, które posiewano na pożywki Columbia, Chapmana, Schaedlera i McConkey'a. Po 24 godzinach hodowli w cieplarni w 37°C izolowano szczepy bakteryjne.

III.II.2.7ii Technika zakładania hodowli komórek izolowanych z węzłów chłonnych pobudzanych PHA, Con A i PWM.

Z pobranych komórek z węzłów chłonnych zakładano hodowle 72-godzinne określając ich stopień autotransformacji i pobudzania PHA, Con A i PWM i 7-dniowe określając ich stopień stymulacji PHA w stężeniu 90µg/ml, oraz atenuowanymi zawiesinami podawanych uprzednio szczepów bakterii: *Micrococcus species*, *Staphylococcus simulans* i *Staphylococcus capitis*.

Węzły pobierano wg techniki opisanej powyżej z zachowaniem zasad aseptyki. Komórki wyczesywano z węzłów jałowymi igłami iniekcyjnymi, zawiesiny filtrowano przez jałowe filtry od zestawów do wlewów dożylnych (Farmachim, Sofia), płukano 2-krotnie w RPMI 1640 z dodatkiem 10% DFCS i wirowano przez 10 minut przy 200g. Następnie zawieszano w RPMI 1640 z dodatkiem 20% DFCS, HEPES (10µmol/100ml), antybiotykami (Penicylina / Streptomycyna: 10000 U+10µg/100ml) i Fungizonu (62.5 µg/100ml, Gibco) w stężeniu 2×10^6 komórek / ml. Do 100 µl zawiesin komórek izolowanych z węzłów chłonnych dodawano po: 4,5, 18 i 90 µg PHA, 1,2 i 5 µg Con A i 1, 5 i 10 µl PWM.

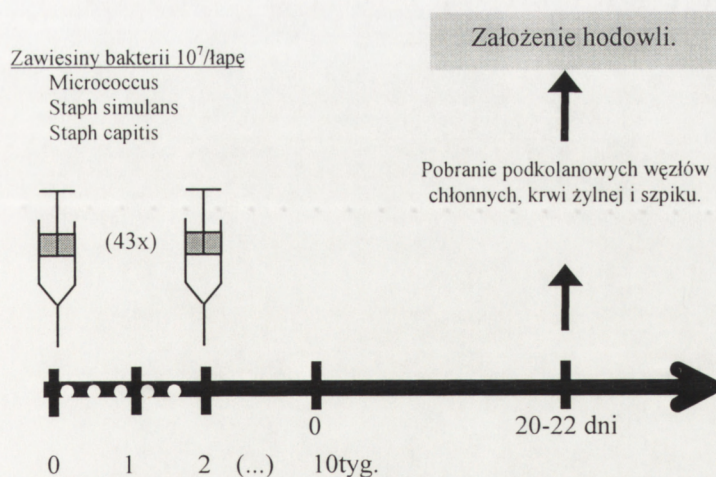
Hodowle utrzymywano na płytkach do hodowli (Nunclon, Nalge Nunc International, Dania) przez 72 godziny w stałej temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Na 18 godzin przed zakończeniem hodowli do każdej z nich dodawano po 25µl H₃-tymidyny (metyl-³H tymidyna, 2.37TBq/mmol, 64Ci/mmol, Amersham Life Science Products, Amersham Pharmacia). Po 3 dobach kończono hodowle przy użyciu harwestera (Micro96, Skatron

Instr., Norwegia) i po wysuszeniu bibuł mierzono promieniowanie w liczniku scyntylacyjnym (LS5000TA, Beckman Instr., USA) w czasie 1 min.

III.II.2.7iii Technika zakładania hodowli komórek izolowanych z węzłów chłonnych stymulowanych atenuowanymi szczepami bakteryjnymi.

Przygotowane komórki wyizolowane z węzłów chłonnych jak uprzednio zawieszano w RPMI 1640 z dodatkiem 20% DFCS, HEPES (10 μ mol/100ml), antybiotykami (Penicylina / Streptomycyna: 10000 U+10 μ g/100ml) i Fungizonu (62.5 μ g/100ml, Gibco) w stężeniu 2x10⁶/ml i do 100 μ l każdej z nich dodawano po 25 μ l (2.5x10⁴ bakterii) podawanych uprzednio atenuowanych szczepów bakterii (autoklawowane przez 20 min w temp. 121°C, 1 atm z następowym sprawdzeniem zawiesiny bakterii w kierunku jej jałowości).

Hodowle utrzymywano przez 6 dni w stałej temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Na 18 godzin przed zakończeniem hodowli do każdej z nich dodawano po 25 μ l ³H-



Protokół doświadczenia III.II.2.7a - c

Wpływ przewlekłego zakażenia bakteryjnego szczepami zasiedlającymi skórę psa na odpływ chłonny

tymidyny. Po 6 dobach kończono hodowle przy użyciu harwestera i mierzono promieniowanie w liczniku scyntylacyjnym (LS5000TA, Beckman Instr., USA) w czasie 1 min.

III.II.2.7iiii Ocena histologiczna rozmazów komórkowych i preparatów tkankowych

Rozmazy komórkowe utrwalano na szkiełkach podstawowych przez 15 min w 100% etanolu, a następnie barwiono techniką May-Grünwald-Giemsy.

Fragmety tkanek utrwalonych w 4% buforowanej formalinie zatapiano w parafinie, krojono mikrotomem na skrawki o grubości 6 μm i po odparafinowaniu w ksylenie i szeregu malejących stężeń alkoholu etylowego barwiono wg techniki HE.

III.II.2.8 Zastosowane techniki statystyczne

Z kolejnych pomiarów w grupach doświadczalnych wyliczano wartości średnie. Wyniki uzyskane w poszczególnych grupach porównywano między sobą posługując się testem parametrycznym t-Studenta i testem Dunnetta. Statystyczną znamienność określono dla $p < 0.05$. Wyniki przedstawiono w postaci graficznej podając wartości średnie i odchylenia standardowe.

IV. WYNIKI

IV.1. Część kliniczna

IV.1.1. Chorzy

Spośród obserwowanych 19 chorych mężczyźni stanowili 57.9% (11 chorych), kobiety - 42,1% (8 chorych). Czas trwania obrzęku wahał się od 3 do 32 miesięcy (7.4 ± 8.0 miesięcy). Przyczyną powstałych zmian u 10 chorych (52.6%) był uraz bezpośredni, zaś u 9 (47.4%) - pośredni. U trzech chorych (15.8%) obrzęk stwierdzano jedynie w tkankach miękkich stopy, u 11 (57.9%) – obrzęk obejmował stopę i podudzie, zaś u 5 (26.3%) – stopę, podudzie i udo.

Największą grupę stanowili chorzy po złamaniach kostek goleni (8 chorych), w tym jeden ze złamaniem powikłanym pełnym zwicnięciem, dwóch z podwichnięciem w stawie skokowym górnym i trzech z rozerwaniem więzozrostu piszczelowo - strzałkowego dalszego, 4 chorych ze złamaniem podudzia, oraz po jednym chorym po: złamaniu podudzia z rozległą raną skalpacyjną obejmującą 80% skóry podudzia i licznymi uszkodzeniami tkanek miękkich, po złamaniu kłykcia bocznego piszczeli, po złamaniu guza piętowego, po złamaniu szyjki kości udowej leczonej operacyjnie met. NS, po podskórnym zerwaniu ścięgna Achillesa leczonym operacyjnie, z raną ciętą grzbietu stopy z uszkodzeniem ścięgien prostowników palców i jedna chora po stłuczeniu podudzia. Operacyjnie leczono 9 chorych (47.4%), zachowawczo - 10 (52.6%) (Tab.IV.1.).

IV.I.2. Obwody kończyn

Analiza różnicy obwodów kończyn wykazała zwiększenie obwodu kończyn z obrzękiem o 1.20 ± 1.65 cm (*) na poziomie łuku stopy, 1.97 ± 1.24 cm (*) 5 cm powyżej kostek, 2.24 ± 1.32 cm (*) na poziomie łydek, i 2.10 ± 1.64 cm (*) na poziomie ud w porównaniu z kończynami kontralateralnymi (*-różnice statystycznie znamienne, p odpowiednio 0.01, 0.0002, 0.0005 i 0.02, test t-Studenta) (Tab.IV.2).

IV.I.3. Pomiary temperatury powierzchni skóry

Badania temperatury mierzonej symetrycznie na obu kończynach wykazały wyższe wartości temperatur kończyn objętych obrzękiem o 0.93 ± 0.81 °C na poziomie kostek i 0.37 ± 0.21 °C (*) na poziomie łydek (*-różnice statystycznie znamienne, $p=0.046$, test t-Studenta) (Tab.IV.3).

IV.I.4. Pomiary tonometryczne

Wykonane badania pomiaru napięcia tkanek przy użyciu tonometru mechanicznego wykazały mniejsze wartości dla kończyn obrzękniętych osiągające wartości indeksów tonometrycznych I_T 85-86% wyników uzyskanych z kończyn kontralateralnych osiągając wartości: 0.86 ± 0.57 (*) przy obciążeniu ciężarkiem 40g, 0.85 ± 0.34 (*) przy obciążeniu ciężarkiem 110g i 0.86 ± 0.28 (*) przy obciążeniu ciężarkiem 180g (*-różnice statystycznie znamienne, p odpowiednio 0.031, 0.023 i 0.018, test t-Studenta) (Tab.IV.4).

IV.I.5. Limfoscyntygrafie

Wykonane limfoscyntygrafie nie uwidocznily u 17 z 19 chorych (89.5%) cech mechanicznego uszkodzenia naczyń chłonnych (blok odpływu, wynaczynianie kontrastu do tkanek). Zmiany te nie uwidocznily się zarówno po urazie bezpośrednim jak i pośrednim, po zmianie trójwymiarowej struktury kończyny (podwichnięcie, zwichnięcie w obrębie stawu), zarówno u chorych leczonych zachowawczo jak i operacyjnie. Natomiast limfoscyntygrafie pokazały u 17 z 19 chorych (89.5%) szybszy odpływ chłonny z objętych obrzękiem kończyn oraz większe zacinienie obrazu naczyń chłonnych sugerujące poszerzenie ich światła. Również obserwowane na limfoscyntygramach obrazy pachwinowych węzłów chłonnych uwidocznily większe pola wychwytu znacznika w węzłach kończyny objętej obrzękiem pourazowym w porównaniu z węzłami kończyny kontralateralnej (Ryc.IV.1).

W dwóch przypadkach (10.5%) znacznik zalegał w okolicy podskórnej wskazując na wynaczynienie znacznika oraz wytworzenie obocznego, podskórnego odpływu chłonnego. Zmiany te zaobserwowano u chorego po złamaniu w wyniku urazu bezpośredniego (uraz „zderzakowy”) obu kości na poziomie 1/3 bliższej podudzia leczonym operacyjnie z obrzękiem trwającym 32 miesiące i u chorej po złamaniu podudzia z rozległą raną skalpacyjną skóry z masywnym uszkodzeniem tkanek miękkich obejmującym 80% obwodu podudzia i stawu kolanowego.

IV.I.6. Wyniki badań Usg - Dopplerowskich

U 5 spośród 19 chorych (26.3%) rozpoznano na podstawie wykonanych badań Usg - Dopplerowskich zakrzepicę obejmującą żyły głębokie podudzia (piszczelowe przednie i tylne oraz strzałkowe) oraz dodatkowo w trzech przypadkach (15.8%) również żyłę podkolanową i w jednym (5.3%) - udową. Ich wyjściowymi przyczynami były (po jednym przypadku) złamania: kłykcia bocznego piszczeli leczone operacyjnie przeszczepem kostnym (z współistniejącą od kilku lat grzybicą paznokci), podudzia z rozległym uszkodzeniem tkanek miękkich i rozległą raną skalpacyjną skóry na poziomie uda, kolana i łydki obejmującą 80% jej obwodu, szyjki kości udowej leczone operacyjnie z następowym usunięciem zespolenia,

trójkostkowe z rozerwaniem więzozrostu piszczelowo – strzałkowego dalszego leczone operacyjnie, spiralne 1/3 dalszej podudzia leczone zachowawczo trzymiesięcznym unieruchomieniem w opatrunku gipsowym udowym.

IV.1.7. Wyniki badań densytometrycznych

W wykonanych u trzech chorych z klinicznie i radiologicznie stwierdzanymi objawami sugerującymi istnienie wczesnej fazy odruchowej algodystrofii współczulnej (obrzęk, żywoczerwone zabarwienie skóry i znaczna tkliwość miejscowa oraz mniejsze uwapnienie kości stopy widoczne na radiogramach) w badaniach densytometrycznych obu goleni stwierdzono występowanie mniejszych wartości BMD w kończynach z obrzękiem pourazowym w porównaniu z kończynami kontralateralnymi (0.389 ± 0.117 i 0.504 ± 0.061 g/cm² - różnice statystycznie znamienne, $p=0.037$, test t-Studenta) (Tab.IV.5).

IV.II. Część doświadczalna

IV.II.2.1. Badanie wpływu bezpośredniego wstrzyknięcia do naczynia chłonnego krwi żyłnej na struktury anatomiczne naczyń chłonnych i węzła chłonnego kończyny.

Wykonane limfografie bezpośrednie w tydzień po podaniu bezpośrednio do naczynia chłonnego 2.0 ml autologicznej krwi żyłnej zarówno z (a.) jak i bez (b.) dodatku cytrynianów wykazały zachowany przepływ w naczyniach chłonnych oraz prawidłową ich strukturę z zachowaniem układu zastawkowego. Obserwacje miejsc wstrzyknięcia zaznaczone luźnymi pętłami jałowego drutu chirurgicznego uwiaryściły zachowaną drożność naczyń na całym ich odcinku (Ryc.IV.2, Ryc.IV.3). W preparatach histologicznych wykonanych ze skóry i tkanki podskórnej, pęczka naczyniowego obejmującego żyłę odstopową z towarzyszącymi jej naczyniami chłonnymi oraz podkolanowego węzła chłonnego nie stwierdzono istnienia zmian patologicznych. W preparatach węzłów chłonnych stwierdzano obecność w cytoplazmie makrofagów złogów hemosydeminy i elementów subkomórkowych, a w niektórych przypadkach całych erytrocytów (Ryc.IV.4 i Ryc.IV.5).

IV.II.2.2. Badanie wpływu podskórnego wstrzyknięcia krwi żyłnej na skład morfotyczny chłonki przedwęzłowej.

Uzyskane wyniki liczby erytrocytów i leukocytów w kolejnych próbkach chłonki przedwęzłowej zbieranych w porcjach co godzinę rozpoczynając 1 godzinę przed wstrzyknięciem po 1.0 ml autologicznej krwi żyłnej podskórną między pazury tylnych łap psów i kontynuując przez 10 godzin po jej wstrzyknięciu wykazały początkowo niewielkie zwiększanie liczby odprowadzanych układem chłonnym erytrocytów w czasie kolejnych czterech godzin po wstrzyknięciu z 5.1 ± 3.2 (wartość wyjściowa - kontrola) do $13.2 \pm 14.1 \times 10^6$ erytrocytów w próbce, po czym 10-20-krotne zwiększenie ich liczby w piętej-siódmej godzinie, osiągając wartości maksymalne w piątej godzinie po wstrzyknięciu $94.3 \pm 109.2 \times 10^6$ erytrocytów w próbce, z następnym zmniejszeniem liczby erytrocytów w kolejnych próbkach chłonki (Ryc.IV.6a). Pomimo obserwowanego wzrostu liczby erytrocytów w chłonce w trakcie przebiegu obserwacji duża rozpiętość uzyskanych w

poszczególnych doświadczeniach wyników pozwoliła na stwierdzenie ich statystycznie znamiennej różnicy w porównaniu z wynikami wyjściowymi w piątej godzinie po wstrzyknięciu krwi (test Dunnetta, Ryc.IV.7.a).

Analiza liczby leukocytów w kolejnych próbkach chłonki przedwężłowej zbieranych w porcjach co godzinę rozpoczynając 1 godzinę przed wstrzyknięciem po 1.0 ml autologicznej krwi żyłnej podskórną między pazury tylnych łap i kontynuując przez 10 godzin po jej wstrzyknięciu, wykazała zmniejszanie się ich liczby z $34 \pm 21 \times 10^4$ (wartość wyjściowa - kontrola) do wartości $21 \pm 11 \times 10^4$ komórek w próbce 1 godzinę po wstrzyknięciu krwi, z następnym stopniowym wzrostem osiągając wartości maksymalne $63.2 \pm 54 \times 10^4$ komórek w próbce w siódmej godzinie i następnie stopniowym zmniejszaniu się ich liczby w porównaniu z wartościami wyjściowymi. (Ryc.IV.6.b). Duża rozpiętość uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach wyników nie pozwoliła na stwierdzenie ich statystycznej znamienności w porównaniu z wynikami wyjściowymi pomimo wzrostu liczby transportowanych leukocytów w każdym badanym przypadku (test Dunnetta, Ryc.IV.7.b).

IV.II.2.3. Badanie dynamiki transportu podanych podskórną erytrocytów, leukocytów i płytek układem naczyń chłonnych.

W czasie kolejnych 6 godzin zbierania chłonki układem chłonnym odprowadzone zostało $0.78 \pm 0.91\%$ wstrzykniętych w przestrzenie międzypazurkowe erytrocytów, $1.59 \pm 2.03\%$ znakowanych FITC i $3.28 \pm 1.81\%$ znakowanych H₃₃₃₄₂ leukocytów. Stwierdzono we wszystkich punktach czasowych statystycznie znaczne zwiększenie odsetka odprowadzanych erytrocytów i znakowanych FITC i H₃₃₃₄₂ leukocytów w porównaniu z wartościami wyjściowymi ($p < 0.05$, test Dunnetta). Obecności wstrzykniętych podskórną płytek krwi w chłonce nie stwierdzono (Ryc.IV.8).

IV.II.2.4. Badanie zmian morfologicznych zachodzących w skórze i tkance podskórnej pod wpływem podskórnego podania komórek krwi i szpiku kostnego.

W preparatach histologicznych barwionych HE wykonanych ze skóry i tkanki podskórnej po trzykrotnym wstrzyknięciu po 1.0 ml autologicznej krwi żyłnej nie obserwowano zmian patologicznych (Ryc.IV.9). W preparatach podkolanowych węzłów chłonnych obserwowano obecność złogów hemosyderyny oraz elementów subkomórkowych erytrocytów w cytoplazmie makrofagów.

W preparatach histologicznych barwionych HE wykonanych ze skóry i tkanki podskórnej po trzykrotnym wstrzyknięciu 10^7 komórek autologicznego szpiku stwierdzano obecność intensywnego odczynu zapalnego w postaci nacieków komórek zapalnych: komórek plazmatycznych, makrofagów i granulocytów (głównie obojętnochłonnych, mniej kwasochłonnych) (Ryc.IV.13).

W preparatach znakowanych immunohistochemicznie przeciwciałami monoklonalnymi przeciw antygenom Mac3, DR, CD3 i CD22 wykonanych z podkolanowych węzłów chłonnych po trzykrotnym podskórnym wstrzyknięciu w okolice grzbietu tylnej łapy autologicznej krwi żyłnej stwierdzono występowanie równomiernie rozmieszczonych o niewielkim wybarwieniu komórek DR+. Występowały one w zatokach brzeżnych (Ryc.IV.12). Obserwowano również dużą ilość równomiernie rozmieszczonych makrofagów (Mac3+) (Ryc.IV.11) oraz normalnie ułożone w strefie przykorowej limfocyty T (CD3+). Rozmieszczenie limfocytów T (CD3+) było równomierne podobnie jak w normalnych węzłach.

W preparatach immunohistochemicznych po wstrzyknięciach komórek szpiku stwierdzono obecność w skórze i tkance podskórnej w miejscu wstrzyknięcia dużej ilości makrofagów (Mac3+), komórek klasy II (DR+): dendrytycznych i makrofagów i limfocytów T (CD3+) (Ryc.IV.14). Obecności limfocytów B (CD22+) nie stwierdzano. Jedynymi komórkami występującymi w tkance podskórnej po wstrzyknięciu krwi (1-2 w preparacie) były nieliczne makrofagi (Mac3+) (Ryc.IV.10).

W preparatach wykonanych z podkolanowych węzłów chłonnych pobranych 7 dni po wstrzyknięciu podskórnym komórek szpiku kostnego barwionych przeciwciałami

monoklonalnymi przeciw Mac3 stwierdzono skupiska makrofagów (komórek Mac3+) (Ryc.IV.15) rozłożonych w węzle w postaci aglomeratów głównie w zatokach brzeżnych i rdzeniowych. Ich obecności nie zaobserwowano w innych topograficznie fragmentach węzła. Stwierdzono również obecność skupisk komórek klasy II (DR+) rozmieszczonych w strefach przykorowych węzła niezależnie od równomiernego rozłożenia strukturalnych komórek DR+ węzła (Ryc.IV.16). Zauważono obecność ogromnych jednojądrzastych i wielojądrzastych komórek DR+, których nie obserwowano w węzłach normalnych. Obserwowano obecność pojedynczych limfocytów B (CD22+) ulokowanych w grudkach chłonnych otoczonych zewnątrznie położonymi limfocytami T (CD3+) tak jak w prawidłowych węzłach. Strefy przykorowe były poszerzone.

IV.II.2.5. Badanie *in vitro* wpływu leukocytów krwi obwodowej i komórek szpiku kostnego na aktywację komórek węzła chłonnego.

W wykonanych autologicznych sześciodniowych hodowlach mieszanych stwierdzono niewielki, ale wyraźny wpływ pobudzający komórek szpiku kostnego na limfocyty węzła chłonnego. Analiza indeksów stymulacji wykazała statystycznie znamienne podwyższone wartości w przypadkach mieszanych hodowli komórek szpiku jako stymulatorów limfocytów węzła (wartości indeksów pobudzenia od 0.27 do 2.31, średnio 1.34 ± 0.75) i w przypadku odpowiadających PBM (wartości indeksów pobudzenia od 0.22 do 7.12, średnio 1.66 ± 2.53) (test t-Studenta, p odpowiednio 0,0022 i 0,0083). (Tab.IV.6., Tab.IV.7., Ryc.IV.17).

IV.II.2.6. Badanie wpływu przewlekłego podawania podskórnym szczepów bakterii zasiedlających skórę łapy psa na struktury anatomiczne naczyń i węzłów chłonnych ocenianych metodą limfograficzną i immunohistochemiczną.

W wykonanych limfografiach bezpośrednich wykonanych po serii 43 podskórnych wstrzyknięć zawiesin bakterii w okolicę grzbietu stopy tylnych łap stwierdzono poszerzenie przedwęzłowych naczyń chłonnych, pojawienie się cech istnienia chłonnego odpływu obocznego oraz powiększenia podkolanowych węzłów chłonnych (Ryc.IV.18).

W komputerowej analizie wskanowanych limfogramów stwierdzono zwiększenie sumarycznego przekroju przedwzłowych naczyń chłonnych w zakresach: $0.68 \div 8.97$ razy (3.183 ± 3.890) dla szczepu *Micrococcus species*, $1.09 \div 10.98$ razy (3.978 ± 4.633) dla szczepu *Staphylococcus capitis* i $1.01 \div 20.48$ razy (6.151 ± 9.798) dla szczepu *Staphylococcus simulans* (w nawiasach wartości średnie \pm SD). Stwierdzono statystycznie znamienne zwiększenie wartości sumarycznych przekrojów przedwzłowych naczyń chłonnych w porównaniu z limfogramami wyjściowymi po wstrzyknięciach zawiesin bakterii wszystkich trzech szczepów ($p < 0.05$, test t-Studenta).

Analiza obrazów podkolanowych węzłów chłonnych wykazała powiększenie ich pól powierzchni w zakresie $1.36 \div 1.64$ (1.435 ± 0.181), $1.62 \div 1.75$ (1.681 ± 0.054) i $2.33 \div 2.57$ (2.451 ± 0.174) razy odpowiednio po wstrzyknięciach zawiesin bakterii szczepów *Micrococcus species*, *Staphylococcus capitis* i *Staphylococcus simulans* (w nawiasach wartości średnie \pm SD). Statystycznie znamienne zwiększenie tych wartości stwierdzono po wstrzyknięciach zawiesin bakterii wszystkich trzech szczepów ($p < 0.05$, test t-Studenta) (Tab.IV.8a).

Analiza mierzonych na standardowych poziomach sumarycznych pól powierzchni przedwzłowych naczyń chłonnych wykazała statystycznie znamienne większe wartości po seriach podawania bakterii szczepów *Staphylococcus capitis* i *Staphylococcus simulans* w porównaniu z bakteriami szczepu *Micrococcus species*. Analiza pól powierzchni podkolanowych węzłów chłonnych nie wykazała istnienia statystycznie znamienych różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi po wstrzyknięciach poszczególnych szczepów bakterii (Tab.IV.8b), (Ryc.IV.19).

W preparatach histologicznych barwionych HE skóry i tkanki podskórnej oraz pęczka naczyniowego obejmującego żyłę i towarzyszące jej przedwzłowe naczynia chłonne nie stwierdzono wyraźnych zmian patologicznych w ścianie naczyń po seriach wstrzyknięć zawiesin żywych bakterii wszystkich trzech szczepów. Natomiast w preparatach wykonanych z podkolanowych węzłów chłonnych obserwowano zmianę struktury w postaci zaniku części przykorowej i grudek rozrodczych, a także znaczne zmniejszenie gęstości limfocytów. Dominował rozrost tkanki łącznej wokół zatok limfatycznych, naczyń

krwionośnych oraz torebki węzła (Ryc.IV.20). Widoczne były także wolne przestrzenie otoczone wałem tkanki łącznej prawdopodobnie po opróżnionych ropniach (Ryc.IV.21).

IV.II.2.7. Badanie pobudzenia *in vitro* komórek węzła chłonnego atenuowanymi szczepami bakterii zasiedlających skórę łapy psa w hodowli limfocytów.

W posiewach wykonanych z podkolanowych węzłów chłonnych psów po serii 43 wstrzyknięć podskórnych zawiesin żywych bakterii hodowano bakterie zarówno w grupach doświadczalnych (11 węzłów) jak i w grupie kontrolnej (2 węzły). Jedynie w jednym przypadku po wstrzyknięciu bakterii i w dwóch w grupie kontrolnej posiewy z węzłów podkolanowych były jałowe. W żadnym przypadku nie stwierdzono obecności bakterii wstrzykiwanych uprzednio szczepów. W 7 przypadkach wyhodowano bakterie szczepów *Staphylococcus aureus*, w 3 *Enterococcus cloacae* i w 3 *Escherichia coli*, zaś w grupie kontrolnej po 1 *Staphylococcus warneri* i *Staphylococcus hominis* (Tab.IV.9).

W 72-godzinnych i 6-dniowych hodowlach limfocytów z węzłów chłonnych podkolanowych izolowanych od psów po 43-krotnym wstrzyknięciu podskórnym zawiesin żywych bakterii szczepów *Micrococcus species*, *Staphylococcus capitis* i *Staphylococcus simulans* stwierdzono większe pobudzenie *in vivo* limfocytów węzłów chłonnych pod wpływem mitogenów PHA, ConA i PWM w stosunku do limfocytów węzłów kontrolnych. (Tab.IV.10, Ryc.IV.22). Uzyskane wyniki były statystycznie znamienne w odniesieniu do stymulacji limfocytów węzła chłonnego po serii wstrzyknięć bakterii szczepu *Staphylococcus capitis* przy stymulacji PHA 4.5 µg/ml; w pozostałych przypadkach nie stwierdzono statystycznej znamienności prawdopodobnie wskutek dużego rozrzutu danych (duży wpływ zmienności osobniczej) i małej liczby zwierząt w każdej z grup.

W hodowlach mieszanych limfocytów węzłów chłonnych pobranych od psów, którym wstrzykiwano podskórnym żywe bakterie szczepów *Micrococcus species*, *Staphylococcus capitis* i *Staphylococcus simulans* z atenuowanymi bakteriami ww szczepów stwierdzono ich mniejsze pobudzanie w porównaniu z limfocytami węzłów pobranych od psów z grupy kontrolnej. Stwierdzono, że atenuowane bakterie szczepu *Micrococcus species* w hodowlach z limfocytami węzłów chłonnych pochodzących od psów, którym podawano podskórnym 43-

krotnie zawiesiny bakterii szczepów *Staphylococcus simulans* i *capitis* pobudzają te limfocyty w stopniu podobnym, a w niektórych przypadkach wyższym niż limfocyty węzłów chłonnych pobranych od zdrowych psów. *Staphylococcus simulans* i *capitis* nie pobudzały limfocytów węzłów psów, którym podawano podskórną bakterie, natomiast miały takie właściwości w stosunku do limfocytów węzłów chłonnych zdrowych psów. Uzyskane wyniki były statystycznie znamienne jedynie w odniesieniu do stymulacji limfocytów węzła chłonnego po serii wstrzyknięć bakterii szczepu *Staphylococcus capitis* przy stymulacji atenuowanymi bakteriami tego szczepu; w pozostałych przypadkach nie stwierdzono statystycznej znamienności prawdopodobnie wskutek dużego rozrzutu danych (duży wpływ zmienności osobniczej) i małej liczby zwierząt w każdej z grup.

Jednocześnie stwierdzono wyższe indeksy stymulacji PHA 90 µg/ml limfocytów podkolanowych węzłów chłonnych u psów po seriach wstrzyknięć wszystkich trzech szczepów bakterii w porównaniu z limfocytami kontrolnych węzłów chłonnych. Uzyskane wyniki były statystycznie znamienne w grupie *Staphylococcus capitis*. (Ryc.IV.23).

V. DYSKUSJA

Patomechanizm powstawania przewlekłego, pourazowego obrzęku kończyn dolnych, a w szczególności czynniki prowadzące do jego utrzymywania się pozostają niejasne. Klasyczne poglądy, że przewlekły obrzęk pourazowy wywołany jest zastojem żylnym powstałym wskutek zakrzepu żył głębokich kończyny i/lub zaburzeniami odpływu chłonnego w następstwie przerwania ciągłości naczyń chłonnych w miejscu urazu (zarówno otwartego jak i zamkniętego) nie wyjaśniają szeregu obserwacji klinicznych poczynionych u chorych z przewlekłymi obrzękami pourazowymi. Nie wyjaśniają obserwacji takich jak: podwyższenie temperatury powierzchni skóry, utrzymywanie się zaczerwienienia i bolesności tkanek i niekiedy zmian zapalnych samej skóry. Powstała więc konieczność przeprowadzenia kompleksowej diagnostyki, w której można by ocenić jednocześnie szereg czynników prowadzących do powstania obrzęku.

Porównanie pomiarów wykonanych w kończynie objętej przewlekłym obrzękiem pourazowym z wielkością obrzęku dokonana została w celu określenia, z jakiego rodzaju procesem mamy do czynienia w uszkodzonej tkance: uszkodzeniem krążenia żylnego, przerwaniem ciągłości naczyń chłonnych i zastojem chłonki, czy też z istnieniem przewlekłego, miejscowego procesu zapalnego. W powyższej pracy ocenianymi parametrami u chorych z przewlekłymi obrzękami pourazowymi kończyn dolnych były wykonywane pomiary obwodów kończyny, temperatury powierzchni skóry podudzi i elastyczności tkanek miękkich łydki oraz odpływów żylnego i chłonnego z kończyny.

Otrzymane wyniki wykazały wzrost standardowo mierzonej temperatury skóry podudzia, wzrost spoistości (zmniejszenie indeksów tonometrycznych) skóry i tkanki podskórnej oraz - co było oryginalną obserwacją - brak oczekiwanego przerwania ciągłości naczyń chłonnych. W obrazach limfoscyntygraficznych zaobserwowano natomiast występujące u ponad 80% chorych (u 17 z 19 chorych) poszerzenie cienia powierzchownego pęczka naczyń chłonnych w obrębie podudzia i uda wraz ze zwiększeniem pól powierzchni pachwinowych i biodrowych węzłów chłonnych. Zmiany o charakterze zakrzepicy diagnozowane metodą Usg-Dopplerowską w układzie żylnym zanotowano jedynie u 26.3% chorych. Opisywane obserwacje w jednakowym stopniu dotyczyły chorych poddanych zabiegowi operacyjnemu jak i leczonych zachowawczo.

W bardzo skąpej literaturze na temat zmian występujących w układzie chłonnym po urazie mechanicznym istnieją doniesienia zbieżne z uzyskanymi w niniejszej pracy. Kittner i wsp. [137] u chorej z przewlekłym obrzękiem pourazowym zaobserwowali zwiększony odpływ chłonny z objętej obrzękiem kończyny bez cech bloku odpływu i wynaczynienia kontrastu oraz brak cech zakrzepicy żyłnej w badaniu Usg-Dopplerowskim. Podobne wyniki uzyskał Douglas [138] analizując obrazy limfoscyntygraficzne 4 chorych (po alloplastykach stawu kolanowego i biodrowego, po tromboembolektomii tętnicy udowej i 1 przypadek lymphangioma po drenażu krwiaka w okolicy pachwiny) z przewlekłymi obrzękami pourazowymi z przyspieszonym odpływem chłonnym z kończyn objętych obrzękiem. Były to w dużej mierze następstwa wykonanych zabiegów operacyjnych. Podobne wyniki uzyskiwano w materiale doświadczalnym. Stosując standaryzowany uraz mechaniczny umiejscowiony w połowie długości podudzia prostopadle do osi długiej kończyny w warunkach doświadczalnych u myszy obserwowałem w ciągu 180 minutowej, bezpośredniej obserwacji w przyżyciowym mikroskopie fluorescencyjnym zachowany odpływ chłonny bez cech wynaczynienia kontrastu, co wykluczało mechaniczne uszkodzenie naczyń chłonnych. Obserwowałem natomiast poszerzenie przedwęzłowych naczyń chłonnych i przyspieszenie odpływu chłonnego z poddanej mechanicznemu urazowi kończyny, co przemawiało za istnieniem zwiększonego odpływu chłonnego, powstałego prawdopodobnie wskutek aktywacji procesu zapalnego w odpowiedzi na uraz mechaniczny [139].

Na podstawie wyników limfografii bezpośredniej wykonywanych u pacjentów po urazach mechanicznych kończyn dolnych Kaindl i wsp. [140] opisali zmiany dotyczące przedwęzłowych naczyń chłonnych w zależności od doznanego urazu wnioskując, że są one odpowiedzialne za występowanie przewlekłego obrzęku pourazowego. Czepelenko [141] opublikował wyniki obserwacji u 21 chorych po złamaniach otwartych kończyn dolnych z ubytkiem 1.5-15 cm kości długich. W obrazach limfografii bezpośredniej wykonanych powyżej 1.5 roku po urazie zaobserwował liczne zaburzenia odpowiedzialne za występowanie obrzęku - blok odpływu chłonki, poszerzenie łoża naczyń chłonnych z wytworzeniem limfatycznego krążenia obocznego w miejscu urazu, oraz dystalnie i proksymalnie do niego. Podobne zmiany Czepelenko zaobserwował u 11 chorych z przewlekłymi obrzękami po złamaniach z ubytkiem kości z następowym wydłużaniem kończyn metodą Ilizarowa [142]. W innym z kolei opracowaniu na podstawie analizy 41 chorych stwierdził blok odpływu w limfografii bezpośredniej u 21

chorych, zaś odpływ wsteczny (niewydolność zastawek) u 35 chorych [143]. Wielu autorów nie potwierdziło bezpośredniego uszkodzenia naczyń chłonnych (blok odpływu) jako przyczyny obrzęków pourazowych. Badając wpływ standaryzowanego urazu bezpośredniego w modelu doświadczalnym na szczurach z następowym unieruchomieniem złamań Georgi i wsp. [144] zaobserwowali zachowanie odpływu chłonnego w naczyniach przedwęzłowych bez cech wynaczyniania kontrastu.

Próba wyjaśnienia zwiększonego odpływu chłonnego, świadczącego o istnieniu zapoczątkowanego przez uraz, miejscowego procesu zapalnego napotyka wiele trudności. O ile niewątpliwy wpływ na jego powstawanie wywierają substancje biologicznie czynne (aminy biogenne, czynniki wzrostu, prostaglandyny, leukotrieny, enzymy i wiele innych) uwalniane w miejscu aktywowanego przez uraz procesu zapalnego, o tyle ich działanie w dystalnych do miejsc urazu częściach kończyny wydaje się być wątpliwe. Próby wyjaśniania ich obwodowego działania na zasadzie prostej dyfuzji z miejsca urazu wydaje się być mało prawdopodobne. Jednak należy spodziewać się, że odgrywają one niewątpliwie znaczną rolę odpływając poprzez drenujące miejsce urazu naczynia żyłne i chłonne - mogą więc w ten sposób wywierać swoje biologiczne działanie proksymalnie do miejsc urazu. Prawdopodobnie niebagatelną rolę odgrywa tu autonomiczny układ nerwowy, który na drodze "zapalenia neurogennego" prowadzić może do zwiększonego przesączania płynu do przestrzeni pozanaczyniowej w dystalnych do miejsca urazu częściach kończyny.

Poszerzenia światła naczyń chłonnych i zwiększenie liczby naczyń w układzie powierzchownym są zwykle spowodowane nadmiarem wytwarzanej chłonki, która musi być odprowadzona z tkanki drogą naczyń chłonnych. Chłonka zawiera znaczną ilość białka, które nie może być absorbowane do układu naczyń żylnych i jest odprowadzane jedynie drogą chłonną [145]. Drugim czynnikiem odpowiedzialnym za rozszerzenie naczyń chłonnych są substancje regulujące proces zapalny, a więc cytokiny, leukotrieny i prostaglandyny [146]. Wiadomo, iż w stanach zapalnych tkanek miejscowy płyn tkankowy i chłonka zawierają wysokie stężenia cytokin i chemokin [147]. Naczynia chłonne mogą także ulegać rozszerzeniu wskutek działania czynników zapalnych bezpośrednio na ich ścianę. Udowodniono hamujący wpływ substancji zawierających hem (hemoglobina, oksyhemoglobina, mioglobina) na zdolność odcinkowego kurczenia się naczyń chłonnych [148]. Ogranicza się wówczas lub całkowicie

ustaje rytmiczna kurczliwość segmentów naczyń chłonnych, co prowadzi do zastojów chłonki w tkankach [149]. Dzienny drenaż chłonny z kończyny dolnej waha się w granicach od 20 do 150 ml chłonki. Istnieją tu duże różnice osobnicze. Jakikolwiek zastój w odpływie chłonki może więc prowadzić do powstania znacznego w objętości obrzęku. W naszych badaniach nie mierzyliśmy ciśnień w naczyniach chłonnych [150], stąd trudne byłoby wnioskowanie, czy zahamowana jest perystaltyka naczyń chłonnych. Analizując limfoscyntygramy można by raczej wnioskować, iż mamy do czynienia z nadmiernym wytwarzaniem chłonki, a dodatkowo z ograniczeniem rytmicznej kurczliwości naczyń. Nadmierne wytwarzanie chłonki występuje w przypadku zwiększenia filtracji kapilarnej, która zależna jest od aktualnego współczynnika przepuszczalności kapilarnej oraz różnicy ciśnień hydrostatycznych i onkotycznych przez ścianę naczynia włosowatego [151]. Zwiększenie przepuszczalności ma miejsce w stanach zapalnych wskutek działania czynników humoralnych na komórkę śródbłonkową. W zastojach żylnych zwiększa się jedynie powierzchnia filtracyjna kapilarów. W przedstawianych badaniach należałoby raczej oczekiwać zwiększonej miejscowej przepuszczalności kapilarnej jako czynnika powodującego wzrost produkcji chłonki, a nie przypisywać go zastojowi żylnemu, ponieważ zmiany zakrzepowe stwierdzano jedynie w niewielkim procencie chorych.

Powiększenie węzłów chłonnych było zupełnie nieoczekiwaną obserwacją. Mogło ono być spowodowane a) czynnikami zapalnymi z miejsca urazu wskutek zakażenia, zarówno przez florę bakteryjną skóry w miejscu urazu jak i przez bakterie dopływające do miejsca urazu z obwodowych części kończyny, skąd są eliminowane drogą chłonną w sposób fizjologiczny b) cytokinami wytwarzanymi w miejscu gojenia się w zasadzie jałowej rany wewnętrznej, c) zakażeniem tkanek w miejscu urazu w czasie zabiegu operacyjnego. Dotychczas nie badano, czy krwiak oraz wynaczynianie komórek szpiku z otwartej jamy szpikowej mogą wywoływać odpowiedź w węzłach chłonnych. Rana operacyjna wydaje się tu odgrywać stosunkowo małą rolę, bowiem nie było różnic w obrazach limfoscyntygraficznych między chorymi operowanymi i leczonymi zachowawczo. Nie wszyscy chorzy mieli złamanie kości, ale wszyscy mieli uszkodzenie okostnej lub aparatu więzadłowo-ścięgnistego. Wiadomo, iż rana okostnej związana jest z nasiloną odpowiedzią komórkowo-humoralną [152, 153, 154].

Takeuchi i wsp. stwierdzili, że w wyniku lizy erytrocytów uwalniana jest substancja mająca zdolność stymulacji do wzrostu wielu typów komórek, w tym limfocytów B i T i fibroblastów [155]. W wyniku dalszych badań stwierdzili, że substancją tą jest katalaza [156].

Zakrzepica żylna jest częstym powikłaniem występującym u chorych po urazach w obrębie kończyn dolnych, co jest związane z m.in. bezpośrednim urazem mechanicznym, zakresem tego urazu oraz zastosowanym leczeniem (w tym operacyjnym) z następowym długotrwałym unieruchomieniem. Częstość występowania zakrzepicy diagnozowanej klinicznie oceniana jest na 2 do 4% chociaż po wprowadzeniu pod koniec lat 60-tych metody pozwalającej na diagnostykę subklinicznie przebiegającej zakrzepicy żylny przy użyciu znakowanego I¹²⁵ fibrynogenu uwidoczniło jej występowanie u 20-44% chorych; największym ryzykiem występowania powikłań zakrzepowych obciążeni są chorzy po alloplastykach dużych stawów (biodrowego i kolanowego); wśród tych chorych ryzyko wystąpienia zakrzepicy żylny sięga nawet 70% [157, 158, 159, 160].

W większości przypadków zakrzepica żylna w obrębie kończyn dolnych przebiega bezobjawowo, z następowym cofnięciem zmian zakrzepowych bez późniejszych następstw patofizjologicznych. Jednak w części przypadków epizod ostrej zakrzepicy żylny prowadzi do zniszczenia układu zastawkowego i powstania przewlekłej niewydolności żylny. Jest ona przyczyną powstania przewlekłych obrzęków kończyn dolnych, dyskomfortu określanego jako uczucie „ciężkich nóg” i powstania w późniejszym okresie zmian troficznych tkanek miękkich [161, 162]. Pomimo wysokiego odsetka występowania zakrzepicy żylny u chorych po urazach kończyn dolnych pytanie, czy powikłanie to prowadzi do przewlekłej niewydolności żylny pozostaje nadal bez jednoznacznej odpowiedzi. Analizując 134 przypadki 14-21 lat po alloplastyce stawu biodrowego Warwick i wsp. [163] stwierdzili, że przewlekła niewydolność żylna występuje jedynie u 9% chorych, u których stwierdzono zakrzepicę żyły udowej (proksymalną) i aż u 25% chorych, u których zakrzepica dotyczyła głębokich żył podudzia (zakrzepica dystalna). Z kolei Biguzzi i wsp. [164] stwierdzili opierając się na badaniach Usg-Dopplerowskich w obserwacjach 41-miesięcznych występowanie przewlekłej niewydolności żylny u 63% pacjentek z przebyłym epizodem ostrej zakrzepicy żylny, chociaż w większości przypadków niewydolność ta była niewielkiego stopnia. Podobne wyniki uzyskali Janssen i

wsp. [¹⁶⁵], którzy stwierdzili występowanie przewlekłej niewydolności żylniej po ostrym epizodzie zakrzepowym u 75% chorych, w tym w 33% przypadków zaawansowaną lub ciężką.

W moich obserwacjach stwierdziłem niski procent powikłań zakrzepowych żył kończyn dolnych objętych przewlekłym obrzękiem pourazowym (5 z 19 chorych – 26.3%). U 14 chorych w badaniach Usg-Dopplerowskich nie obserwowano zarówno istnienia cech czynnej zakrzepicy ani też cech przewlekłej niewydolności żylniej takich jak niewydolność zastawek czy zwolnienie przepływu krwi w powierzchownym i głębokim układzie żylnym kończyny, co stawia obrzęk pochodzenia zastoinowego na dalszym miejscu. W mojej pracy obserwacją objąłem chorych z obrzękiem trwającym od 3 do 32 miesięcy po urazie (średnio 7.4 ± 8.0 miesięcy); niewykluczone więc, że u części z nich pierwotnie przebiegająca subklinicznie zakrzepica żylna uległa samoistnemu wyleczeniu bez następstw patofizjologicznych. Jednak przy braku cech przewlekłej niewydolności żylniej trudno obarczać przebyłą, subklinicznie przebiegającą zakrzepicę odpowiedzialnością za powstały przewlekły obrzęk pourazowy.

Nie wiadomo dotychczas dokładnie, jak dochodzi do powstania zakrzepów w uszkodzonych tkankach. Zastój żylny, żyłaki podudzi, podeszły wiek, otyłość, współistniejące choroby nowotworowe, przyjmowanie doustnych leków antykoncepcyjnych, rozległe urazy, wrodzone i nabyte zaburzenia układu krzepnięcia oraz zakażenia są czynnikami predysponującymi do wystąpienia zakrzepicy żylniej. Uwolniony czynnik tkankowy odgrywa tu rolę w początkowym okresie po urazie, ale nie wydaje się prawdopodobne, aby działał on w ciągu tygodni i prowadził także do zakrzepów w centralnych żyłach kończyny. W moich obserwacjach występowanie zakrzepicy żylniej stwierdziłem u 5 chorych, przy czym u wszystkich chorych występowały co najmniej trzy czynniki predysponujące do wystąpienia zakrzepicy. Były nimi: rozległe urazy, podeszły wiek, otyłość, nadużywanie alkoholu i tytoniu i współistnienie przewlekłych zakażeń w obrębie kończyn dolnych. Interesujące jest spostrzeżenie, że zakrzepica żylna współuczestniczy ze złamaniami w obrębie nasad i przynasad, tj miejsc z największym nagromadzeniem szpiku kostnego.

Osobny problem stanowi algodystrofia, na którą składają się bolesność skóry, jej przekrwienie, obrzęk i demineralizacja kości oraz nadmierna przepuszczalność kapilarna [¹⁶⁶, ¹⁶⁷, ¹⁶⁸]. Znaczna liczba przypadków publikowanych przez autorów zajmujących się problematyką tej jednostki chorobowej pozwala przypuszczać, że w wielu przypadkach jest ona

przeoczana, a jej występowanie jest dużo częstsze, niż się powszechnie uważa. Sprzyja temu fakt, że w większości przypadków objawy choroby ulegają samoistnemu cofnięciu bez następstw patologicznych. Obserwując naturalny przebieg i późne następstwa odruchowej dystrofii współczulnej w grupie 30 chorych Żyluk [169] stwierdził samoistne cofnięcie objawów w ciągu 13 miesięcznej obserwacji. Typowym obrazem występującej algodystrofii jest następowanie w przeciągu krótkiego czasu po urazie niewspółmiernie wyrażonego w stosunku do doznanego urazu bólu, po którym następują objawy obwodowego zaburzenia krążenia, w tym obrzęk. Tego rodzaju zmiany, o niejasnej etiologii, rozwijają się powoli, podczas gdy u badanych chorych obrzęk ujawniał się natychmiast lub w kilka dni po urazie.

Opisane obserwacje zmieniają znacznie pogląd na patogenezę utrzymywania się obrzęków pourazowych związanych z uszkodzeniem kości, okostnej, więzadeł, ścięgien i tkanek miękkich, kierując uwagę w stronę procesu zapalnego, oddalając się od dotychczasowej interpretacji, według której przyczyną był zastój żylny i limfatyczny. Na podstawie przeprowadzonych badań klinicznych można by podejrzewać, iż w miejscu gojenia się wewnętrznej rany pourazowej rozwija się proces zapalny. Gojenie się rany jest, analizując ów proces na poziomie molekularnym, procesem zapalnym. W przypadku zmian urazowych w kończynie będzie ono dotyczyło kości z okostną, tkanki podskórnej i ew. skóry. Pod uwagę powinno być brane uszkodzenie pęczka naczyniowo - nerwowego, nawet bardzo obwodowego [169, 170]. Niejasne jest jednak, dlaczego proces pourazowy jest w kończynie dolnej zwykle bardzo nasilony i trwa przez wiele miesięcy, podczas gdy rzadko jest on obserwowany w kończynach górnych. W procesie zapalnym uczestniczą w zależności od fazy procesu komórki układu mieloidalnego a następnie limfoidalnego, ma miejsce miejscowa produkcja cytokin prozapalnych i antyzapalnych zarówno przez wymienione linie komórkowe jak i fibroblasty i komórki śródbłonkowe. Miejscowa hipercytokinemia wpływa na populacje komórkowe regionalnych węzłów chłonnych. Komórki z miejsca stanu zapalnego oraz czynniki humoralne są drenowane drogą naczyń chłonnych do węzłów [171]. Tam można oczekiwać odpowiedzi komórkowej w postaci aktywacji limfocytów i wysyłania na obwód komórek efektorowych. Cytokiny działają na czynniki transdukcyjne w limfocytach oraz profesjonalnych i nieprofesjonalnych komórkach prezentujących antygen [172]. W procesie gojenia się ran kości odgrywają rolę, poza cytokinami aktywnymi w ranach tkanek miękkich, białka osteogenne i cytokiny hemopoetyczne z wyznaczonym go szpiku.

Uzyskane obserwacje kliniczne stworzyły szereg pytań, na które odpowiedź mogły przynieść tylko badania doświadczalne. Podstawowym pytaniem było czy udokumentowane w obrazach limfoscyntygraficznych zmiany mogły być wywołane przewlekłym procesem zapalnym w miejscu urazu. Z czynników, które mogły być odpowiedzialne za zmiany zapalne należy wyliczyć wynaczynioną krew, wynaczynione elementy szpiku kostnego oraz kolonizację bakteryjną. Sytuacje, w których można zbadać patogeny wpływ wymienionych czynników wytworzono w doświadczeniach na psach.

Stwierdzono, iż pełna świeża krew podana bezpośrednio do naczynia chłonnego nie wywoływała żadnych zmian zarówno w obrazie limfograficznym jak i w badaniach immunohistochemicznych. Wszystkie białka krwi ulegają przesączaniu z szybkością odwrotnie proporcjonalną do ich wielkości. Są one następnie odprowadzane z tkanek układem naczyń chłonnych. Jak stwierdzili Le i wsp.^[173] w warunkach fizjologicznych chłonka zawiera wszystkie białka układu krzepnięcia w stężeniach: 28% fibrynogenu, 26% protrombiny, 27% czynnika X, 17% - cz.VII, 8% - cz.V i VIII, 10% - czynnika von Willebranda (podane jako odsetki stężeń tych czynników we krwi). Jak zaobserwowałem w przeprowadzonych doświadczeniach podana bezpośrednio do naczynia chłonnego krew nie krzepła, o czym świadczył zachowany przepływ kontrastu naczyniami chłonnymi, do których podawałem uprzednio autogenną krew żylną zarówno z jak i bez dodatków antykoagulantów. Wynika z tego, że istnieją mechanizmy utrzymujące chłonkę w obrębie naczynia chłonnego w stanie płynnym. Przypuszczalnie są to mechanizmy podobne do tych utrzymujących krew w naczyniach krwionośnych w stanie płynnym.

Szczególnie ważną fizjologiczną jak i w niektórych sytuacjach patogeną rolę odgrywają po wynaczynieniu w tkankach granulocyty, limfocyty oraz płytki krwi. Te elementy komórkowe są eliminowane z tkanki drogą limfatyczną. Dotychczas nie udało się wykazać, aby komórki układu białokrwinkowego mogły penetrować od zewnątrz ścianę kapilarów żylnych i wnikać do krążenia krwi. Wiadomo, iż erytrocyty wpływają do początkowych naczyń limfatycznych w tkance z prądem płynu tkankowego, natomiast limfocyty wędrują samodzielnie do tych naczyń w określonym tempie ^[174, 175, 176]. W przedstawianych doświadczeniach limfatyczny transport znakowanych erytrocytów podanych pod skórę wynosił po 6 godzinach około 1%, zaś granulocytów około 2%, granulocytów i limfocytów powyżej 3%. Ten niski odsetek komórek

krwiaka usuwanych drogą chłonną był zależny od liczby początkowych naczyń chłonnych w miejscu podania, a także od wielkości wytworzonego krwiaka. Droga, którą musiał przebyć granulocyt i limfocyt z wnętrza krwiaka do jego obwodu zajmowała zapewne wiele godzin. Według uzyskanych danych, jedynie droga od miejsca wstrzyknięcia komórek do drenowanego naczynia chłonnego długości zajmowała około 3 godzin.

Zgodnie z oczekiwaniami płytki krwi nie wnikały do naczyń chłonnych, prawdopodobnie wskutek ich agregacji w miejscu wynaczynienia (podania) [¹⁷⁷].

Tak więc drenaż elementów morfotycznych krwi z doświadczalnego krwiaka był ilościowo ograniczony. Wiadomo jednak, iż do zapoczątkowania procesu odpowiedzi w węzle chłonnym potrzebne jest jedynie kilkadziesiąt komórek, zwłaszcza wówczas, kiedy są to profesjonalne komórki prezentujące antygen [Olszewski i wsp. 1995].

Zmiany obserwowane w regionalnych węzłach chłonnych po podskórnym podaniu krwi były ograniczone do pojawienia się obecności makrofagów wypełnionych złogami hemosyderyny, jak również międzykomórkowych złogów tego związku. Nie obserwowałem cech pobudzenia komórek węzła w części przykorowej oraz w grudkach rozrodczych. Można by więc wyciągnąć wniosek, iż elementy komórkowe krwi nie wywołują odpowiedzi komórkowej typu autologicznego w skórze, naczyniach i węzłach chłonnych.

Nieoczekiwaną obserwacją było natomiast stwierdzenie intensywnego, miejscowego procesu zapalnego w skórze po podaniu komórek szpiku. W preparatach histologicznych wykonanych z tkanek pobranych z miejsc wstrzyknięcia dominowały granulocyty i makrofagi. W obrazach immunohistochemicznych widoczne były komórki Mac3+, DR+, oraz nieliczne CD3+. Niewyjaśnione pozostaje pochodzenie nagromadzonych komórek. Nie wiadomo, czy były to wstrzyknięte uprzednio podskórnio komórki szpiku, czemu przeczyłaby znaczna gęstość granulocytów, czy też następowało krwiopochodne gromadzenie granulocytów wskutek ich miejscowej chemoatrakcji. Mogłoby to być spowodowane działaniem cytokin i czynników wzrostu uwalnianych przez wynaczynione do tkanek miękkich komórki szpiku. Komórki szpiku różnych linii oraz znajdujące się między nimi komórki zrębowe posiadają silne właściwości wytwarzania szeregu cytokin i chemokin takich jak: G-, M-, GM-CSF, IL1, IL6 i innych powodujących rekrutację migrujących komórek [^{178, 179}].

W węzłach chłonnych drenujących skórę, pod którą podano komórki szpiku, stwierdzono w zatokach brzeżnych i rdzeniowych skupiska dużych komórek barwiących się przeciwciałem przeciw antygenowi Mac3 oraz również w skupiskach komórki DR+. Natomiast strukturalne komórki makrofagalne i DR+ węzła były rozmieszczone równomiernie. Poza tym stwierdzono poszerzenie części przykorowych oraz powiększenie grudek rozrodczych. Te obrazy świadczyły o gromadzeniu się podanych podskórnym komórkom szpikowym w zatokach limfatycznych węzła i o pobudzeniu limfocytów T i częściowo B. Komórki szpiku poza dojrzałymi limfocytami nie należą do populacji migrujących. Musiały więc być przenoszone do węzła z prądem chłonki. Znaczna ich część pozostawała jednak w miejscu podania. Mechanizm reakcji po podskórnym podaniu szpiku pozostaje niejasny szczególnie dlatego, że zjawisko to ma miejsce w układzie autogennym. Można jednak przypuszczać, iż mamy tu do czynienia z sytuacją analogiczną do zjawiska autologicznej mieszanej reakcji limfocytów [180].

Obserwacje *in vivo* odczynu skóry i węzłów chłonnych na obecność komórek szpiku wskazały na konieczność wykonania mieszanych hodowli komórek szpiku i limfocytów węzła chłonnego. Stwierdzono na ich podstawie, iż ma miejsce pobudzenie izolowanej populacji komórek węzła w 72-godzinnej hodowli z komórkami szpiku hamowanymi mitomycyną C. Indeks pobudzenia nie przekraczał 2, ale był obserwowany we wszystkich wykonanych doświadczeniach. Zmiany typu zapalnego po miejscowym podaniu komórek szpiku, a więc sytuacji podobnej do miejscowego wynaczynienia szpiku wskazują, iż uzyskane w klinice obserwacje powiększonych węzłów chłonnych można by tłumaczyć odczynem na komórki szpiku i ich produkty humoralne. Dotychczas nie zaproponowano takiej koncepcji, aczkolwiek wynaczynienie szpiku jest często obserwowane po złamaniach kości i operacjach na układzie kostnym [181, 182].

Kolejnym czynnikiem, który może być odpowiedzialny za proces zapalny w miejscu urazu oraz w drenujących naczyniach i węzłach chłonnych, są drobnoustroje. Mogą one penetrować tkanki w miejscu mikrouszkodzeń lub makrouszkodzeń skóry, jak również mogą dostać się do zmienionych urazowo tkanek drogą naczyń chłonnych z obwodu kończyny. W warunkach normalnych ma miejsce transport mikroorganizmów i nieorganicznych cząstek przenikających przez skórę, śluzówkę jelita czy nabłonek płucny drogą naczyń chłonnych do regionalnych węzłów chłonnych. Badania przeprowadzone u ludzi wykazały to zarówno u osobników zdrowych jak i z zastojem chłonnym w kończynach dolnych [183]. W przypadku zastoju

chłonnego, częstość wyhodowania izolatów może sięgać 80%. Przy nieuszkodzonych pniach naczyń chłonnych drobnoustroje mogą przenikać przez ich ścianę w mechanizmie inkorporacji przez śródbłonek naczyń chłonnych i wydalania ich na zewnątrz naczynia [¹⁸⁴].

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazałem, że 6-tygodniowe, podskórne podawanie w grzbiet łapy drobnoustrojów wyhodowanych z powierzchni stopowej skóry psów wywoływało znaczne rozszerzenie przedwęzłowych naczyń chłonnych oraz zwiększenie w obrazach limfograficznych pola podkolanowych węzłów chłonnych. Obrazy te w dużej mierze przypominały obrazy limfoscyntygraficzne uzyskiwane u chorych z obrzękami pourazowymi kończyn dolnych.

Zastosowane w doświadczeniu drobnoustroje hodowane z powierzchni stopy należały do saprofitów i zapewne nie miały powinowactwa do struktur błonowych śródbłonek limfatycznych. Niemniej jednak wywoływały one widoczne zmiany w obrazach limfograficznych. Największe zmiany obserwowano po podawaniu bakterii szczepu *Staphylococcus capitis* oraz nieco mniejsze po podaniu bakterii szczepu *Staphylococcus simulans*.

Badania histologiczne skóry, tkanki podskórnej i naczyń przedwęzłowych nie wykazały zmian, mimo codziennego 6-tygodniowego podskórnego podawania bakterii. Może to świadczyć o efektywnym szybkim usuwaniu antygeny bakteryjnego przez układ fagocytarny. Natomiast podkolanowe węzły chłonne ulegały opustoszeniu z limfocytów, wokół zatok limfatycznych proliferowała tkanka łączna, oraz widoczne były miejsca po ropniach otoczone wałem łącznotkankowym. Najbardziej zaawansowane zmiany obserwowano po podawaniu bakterii szczepu *Staphylococcus simulans*, znacznie mniej wyrażone zmiany obserwowano po podawaniu bakterii szczepu *Staphylococcus capitis*; najmniej – *Micrococcus species*.

Interesująca była obserwacja wyhodowania z węzłów kończyn, do których podskórnie podawano *Micrococcus species*, *Staphylococcus capitis* i *simulans* zupełnie innych szczepów, a mianowicie *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Tego rodzaju różnice obserwowano również w klinice, izolując inne szczepy z powierzchni skóry, z płynu tkankowego i węzłów chłonnych. Można by zaryzykować twierdzenie, że te ostatnie są drobnoustrojami stale penetrującymi skórę, na które wytworzyła się pewnego rodzaju "tolerancja". Natomiast podawane podskórnie szczepy były szybko usuwane przez układ fagocytarny.

Pomimo znacznej deplecji komórkowej, węzły chłonne zawierały populacje limfocytów odpowiadające na poszczególne mitogeny. Co więcej, odpowiedź ta była wyższa niż odpowiedź limfocytów izolowanych z normalnych węzłów kontrolnych. Limfocyty zachowywały więc zdolność ogólnej odpowiedzi, natomiast utraciły ją w odniesieniu do antygenów podawanych uprzednio podskórnie testowanych 3 szczepów bakterii. Jedynie *Micrococcus species* zachował pewien zakres zdolności pobudzania limfocytów. Ta obserwacja jest szczególnie interesująca, ponieważ wskazuje na możliwość deplecji klonalnej limfocytów reagujących na podawany antygen bakteryjny.

VI. PODSUMOWANIE

- 1) U chorych z obrzękiem urazowym w większości przypadków (17 z 19) w obrazie limfoscyntygraficznym stwierdziłem poszerzenie cienia naczyń oraz pachwinowych węzłów chłonnych. Wśród badanych chorych jedynie w 2 przypadkach stwierdziłem obecność zaburzeń odpływu chłonnego pod postacią podskórnego odpływu chłonki. Przeprowadzone pomiary obwodów kończyn, temperatury powierzchni skóry i pomiary tonometryczne pozwoliły na ilościową ocenę zachodzących zmian. W objętej obrzękiem kończynie stwierdziłem zwiększenie obwodu kończyny, podwyższoną ciepłotę powierzchni skóry i obniżenie indeksu tonometrycznego.
- 2) Jedynie u 5 z 19 badanych chorych (26.3%) miała miejsce zakrzepica żył głębokich podudzia rozpoznawana metodą ultrasonograficzną.
- 3) W przeprowadzonych na psach doświadczeniach badałem, które składowe zmiany pourazowych mogą wywoływać poszerzenie naczyń i węzłów chłonnych. Wytworzenie modelu krwiaka pourazowego poprzez podskórne podanie krwi nie wywoływało zmian immunohistochemicznych w skórze, przedwęzłowych naczyniach i podkolanowych węzłach chłonnych. Świeża krew podana bezpośrednio do naczyń chłonnych nie powodowała zamknięcia ich światła.
- 4) W ciągu pierwszych 6 godzin po wynaczynieniu krwi w modelu krwiaka pourazowego zaledwie 1-3% znakowanych erytrocytów i leukocytów wchłaniało się drogą chłonną. Znakowane płytki krwi pozostawały w tkankach w miejscu podania i nie znajdowałem ich w przedwęzłowych naczyniach chłonnych.
- 5) Komórki autologicznego szpiku kostnego podane podskórnie wywoływały odczyn komórkowy typu zapalnego z naciekami granulocytarnymi i jednojądrzastymi w skórze oraz gromadziły się w węzłach chłonnych. W węzłach widoczny był w zatokach odczyn makrofagalny oraz poszerzenie przykorowych obszarów komórek T, zaś *in vitro*, w mieszanej, autologicznej hodowli komórki szpiku pobudzały limfocyty węzłów chłonnych.
- 6) Po 6-tygodniowym podawaniu żywych bakterii 3 szczepów wyhodowanych z powierzchni skóry łapy psa obserwowałem rozszerzenie odstopowych naczyń chłonnych i powiększenie podkolanowych węzłów chłonnych. Nie zanotowałem zmian w skórze w miejscu podawania

VI bakterii oraz w drenujących te miejsca naczyniach chłonnych, natomiast w węzłach chłonnych widoczne były pozapalne zmiany włókniste oraz jamy po ropniach. W węzłach widoczna była deplecja limfocytów znacznego stopnia. Limfocyty węzłów odpowiadały na mitogeny w stopniu nieco większym niż limfocyty pobrane z węzłów chłonnych zwierząt kontrolnych, natomiast nie odpowiadały na antygen bakterii podawanych przez 6 tygodni pod skórę łapy.

VI. WNIOSKI

- 1) Pourazowy obrzęk kończyny dolnej u człowieka wydaje się być przede wszystkim obrzękiem towarzyszącym przewlekłemu procesowi zapalnemu powstałemu w miejscu urazu. Świadczyły o tym: podwyższona ciepłota skóry, obniżenie indeksu tonometrycznego i obraz limfoscycytygraficzny.
- 2) W mechanizmie rozwoju miejscowego stanu zapalnego krwiak powstający w miejscu urazu nie wydaje się być niezależnym czynnikiem patogenetycznym, natomiast wynaczynienie szpiku kostnego wydaje się odgrywać rolę w utrzymywaniu się niespecyficznego procesu zapalnego. Niezależną patogenną rolę może odgrywać zakażenie tkanek po urazie wynikające z ich kontaminacji bezpośrednio poprzez uszkodzoną skórę, jak i drobnoustrojami dopływającymi ze stopy drogą naczyń chłonnych.
- 3) Układ chłonny kończyny (chłonka, naczynia i węzły chłonne) ulegają pobudzeniu po urazie mechanicznym tkanek kończyny.

VII. TABELLE

Tab.IV.1 Rozpoznanie, zastosowane leczenie i powikłania pacjentów z obrzękami pourazowymi kończyn dolnych.

		Złamanie kostek podudzia		złamanie podudzia		złamanie podudzia z rozległą raną skalpacyjną	złamanie kłykcia bocznego piszczeli	złamanie guza piętowego	złamanie szyjki kości udowej	zerwanie ścięgna Achillesa	rana cięta grzbietu stopy z uszkodzeniem ścięgien	stłuczenie podudzia
liczba pacjentów		8		4		1	1	1	1	1	1	1
leczenie		operacyjne	zachowawcze	operacyjne	zachowawcze	zachowawcze	operacyjne	Zachowawcze	operacyjne	operacyjne	operacyjne	zachowawcze
liczba pacjentów		3	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1
cechy zakrzepicy żyłnej w Usg		1			1	1	1		1			
algodystrofia			2					1				
Lsg	cechy uszkodzenia naczyń chłonnych			1		1						
	poszerzone pola powierzchni wyznakowanych naczyń chłonnych	3	4	2	1	odpływ skórny	1	1	1	1	1	1
	Zwiększone pola powierzchni wyznakowanych węzłów chłonnych	3	4	1	1	-	1	1	1	1	1	1

Tabela IV.2. Wyniki pomiarów obwodów kończyn mierzonych na poszczególnych poziomach. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD) różnic obwodów kończyn objętych obrzękiem i kończyn kontralateralnych.

(*) statystycznie znamienne różnice ($p < 0,05$) w porównaniu z wynikami uzyskanymi z kończyny kontralateralnej (test t-Studenta), $n=19$.

Poziom pomiaru	Na szczycie łuku stopy	5 cm powyżej kostki przyśrodkowej	10 cm poniżej guzowatości piszczeli	15 cm powyżej dolnego bieguna rzepki
Wynik pomiaru (cm)	1,20 \pm 1,65 (*)	1,97 \pm 1,24(*)	2,24 \pm 1,32(*)	2,10 \pm 1,64(*)

Tabela
nina
kończ

Tabela IV.3. Wyniki pomiarów temperatury skóry mierzonej na przednio- przyśrodkowej powierzchni goleni 5 cm powyżej kostki przyśrodkowej i na przyśrodkowej powierzchni łydki. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD) różnic temperatury skóry kończyn objętych obrzękiem i kończyn kontralateralnych.

(*) statystycznie znamienne różnice ($p < 0,05$) w porównaniu z wynikami uzyskanymi z kończyny kontralateralnej (test t-Studenta), $n=19$.

Poziom pomiaru	na przednio- przyśrodkowej powierzchni goleni 5 cm powyżej kostki przyśrodkowej	na przyśrodkowej powierzchni łydki
Wynik pomiaru ($^{\circ}\text{C}$)	0,93 \pm 0,81	0,37 \pm 0,21 (*)

Tabela IV.4. Wyniki indeksów tonometrycznych I_T (wynik uzyskany z łydki objętej obrzękiem pourazowym / wynik uzyskany z łydki kończyny kontralateralnej) przy użyciu ciężarków 40, 110 i 180 g. Wyniki przedstawione jako wartości średnie \pm SD (odchylenie standardowe).

(*) statystycznie znamienne różnice ($p < 0,05$) w porównaniu z wynikami uzyskanymi z kończyny kontralateralnej (test t-Studenta), $n=19$.

Masa ciężarka	40 g	110 g	180 g
I_T	$0,86 \pm 0,57 (*)$	$0,85 \pm 0,34 (*)$	$0,86 \pm 0,28 (*)$

Tabela IV.5. Wyniki pomiarów densytometrycznych mineralnej gęstości kości (BMD – bone mineral density) na poziomie $\frac{1}{2}$ dalszej goleni objętej obrzękiem i na analogicznym poziomie kończyny kontralateralnej. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD) w g/cm^2 .

(*) statystycznie znamienne różnice ($p < 0,05$) w porównaniu z wynikami uzyskanymi z kończyny kontralateralnej (test t-Studenta), $n=3$.

Poziom pomiaru	BMD dla kończyny objętej obrzękiem pourazowym	BMD kończyny kontralateralnej
Wynik pomiaru (g/cm^2)	$0,389 \pm 0,117 (*)$	$0,504 \pm 0,061 (*)$

Tabela IV.6. Wpływ komórek szpiku kostnego (BMC) i leukocytów krwi obwodowej (PBM) na autologiczne limfocyty węzła chłonного (LN) zdrowych psów *in vivo*. LN_x, PBM_x i BMC_x - komórki blokowane mitomycyną C. 6-dniowe hodowle mieszane PBM, BMC, LN, PBM_x, LN_x i BMC_x w proporcjach komórek odpowiadających i pobudzających 1:1 i 1:0.5. LN_x, PBM_x i BMC_x – komórki blokowane mitomycyną C. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD bezwzględnych wartości CPM, n=4. Opracowanie statystyczne na następnej stronie.

	LN	PBM	BMC	LN _x (1:1)	LN _x (1:0.5)	PBM _x (1:1)	PBM _x (1:0.5)	BMC _x (1:1)	BMC _x (1:0.5)	
Autotransformacja	x	362,50	226,25	171,67	90,50	77,88	71,00	44,75	43,67	63,67
	SD	417,81	252,02	78,51	91,60	53,96	31,18	10,05	3,51	31,50
PHA 90 µg/ml	x	9660,50	5551,75	832,50	100,25	70,25	125,00	104,00	49,00	67,33
	SD	5717,82	2189,09	317,49	50,30	34,14	45,00	64,82	13,75	25,54
LN	x		351,50	412,50			250,75	365,13	346,60	577,80
	SD		362,89	322,21			280,19	438,12	241,97	234,82
PBM	x	351,50		260,25	126,13	144,43			300,67	196,00
	SD	362,89		75,83	72,08	123,37			211,08	178,19
BMC	x	337,50	260,25		201,71	241,43	198,33	148,00		
	SD	249,16	75,83		194,34	195,64	135,78	43,71		

Tabela IV.7. Wpływ komórek szpiku kostnego (BMC) i mononuklearów krwi obwodowej (PBM) na stymulację limfocytów węzła chłonnego (LN). LN_x, PBM_x i BMC_x - komórki blokowane mitomycyną C. 6-dniowe hodowle mieszane PBM, BMC, LN, PBM_x, LN_x i BMC_x w proporcjach komórek odpowiadających i pobudzających 1:1 i 1:0.5. LN_x, PBM_x i BMC_x – komórki blokowane mitomycyną C. Wyniki przedstawiono jako wartości indeksów (wartość / suma autotransformacji komórek w hodowli). Wartości średnie ± SD, n=4.

(*) statystycznie znamienne (p<0.05) różnice w stosunku do wyników autotransformacji (test t-Studenta). Poniżej wyniki współczynnika p.

		LN	PBM	BMC	LN _x (1:1)	LN _x (1:0.5)	PBM _x (1:1)	PBM _x (1:0.5)	BMC _x (1:1)	BMC _x (1:0.5)
PHA 90 µg/ml	X	34,99 (*1)	45,94 (*2)	4,32 (*5)	1,29	1,29	1,87 (*8)	2,68	1,11	1,13
	SD	18,76	38,78	2,68	0,62	0,64	0,75	2,44	0,23	0,29
LN	X		1,66 (*3)	1,34			1,74	5,46	3,40	5,95
	SD		2,53	0,75			2,68	9,52	2,89	6,00
PBM	X	1,66 (*3)		1,77 (*6)	0,55	0,63			1,84	0,39
	SD	2,53		2,12	0,24	0,80			2,39	0,10
BMC	X	1,34	1,77 (*4)		4,65	0,62 (*7)	0,77	0,71 (*9)		
	SD	0,75	2,12		7,32	0,32	0,34	0,16		

(*1) p=0.001

(*2) p=0.001

(*3) p=0.008

(*4) p=0.002

(*5) p=0.001

(*6) p=0.002

(*7) p=0.011

(*8) p=0.048

(*9) p=0.003

Tabela IV.8a Wpływ 43-krotnego podskórnego podawania w okolicę grzbietu łapy psa po 10^7 komórek żywych bakterii szczepów *Micrococcus species*, *Staphylococcus capitis* i *Staphylococcus simulans* na zwiększenie sumarycznych pól przekrojów poprzecznych przedwęzłowych naczyń chłonnych i pól powierzchni podkolanowych węzłów chłonnych ocenianych na limfogramach w limfografii bezpośredniej. Wyniki przedstawiono jako krotność zwiększenia parametrów (wartości średnie \pm SD) po serii wstrzyknięć w stosunku do wartości uzyskanej na limfogramach wyjściowych.

(*) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice po serii wstrzyknięć w stosunku do limfogramów wyjściowych, (test t-Studenta). W nawiasach poniżej wyniki współczynnika p.

	<i>Micrococcus species</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
Krotność zwiększenia sumarycznych pól powierzchni przedwęzłowych naczyń chłonnych	3.183 \pm 3.890 (p= 0.107)	3.978 \pm 4.633 (*) (p= 0.026)	7.651 \pm 11.424 (p= 0.204)
Krotność zwiększenia pól powierzchni podkolanowych węzłów chłonnych	1.435 \pm 0.181 (*) (p=0.009)	1.681 \pm 0.054 (*) (p=0.012)	2.451 \pm 0.174 (p=0.058)

Tabela IV.8b Porównanie krotności zwiększenia sumarycznych pól powierzchni przedwęzłowych naczyń chłonnych (**czzerwone**) i podkolanowych węzłów chłonnych (**zielone**) pomiędzy poszczególnymi szczepami bakteryjnymi. Wyniki przedstawiono jako współczynniki p. (*) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami bakteryjnymi. (test t-Studenta).

	Micrococcus species	Staphylococcus capitis	Staphylococcus simulans	Przedwęzłowe naczynia chłonne
Micrococcus species		p=0,041 (*)	p=0,043 (*)	
Staphylococcus capitis	p=0,416		p=0,061	
Staphylococcus simulans	p=0,348	p=0,382		
Podkolanowe węzły chłonne				

Tabela IV.9. Wyniki posiewów bakteryjnych z podkolanowych węzłów chłonnych wykonanych 21 dni po serii 43 wstrzyknięć podskórnych zawiesin żywych bakterii szczepów obecnych na skórze psa.

Nr psa	Szczep	Ilość bakterii w 1 wstrzyknięciu	Ilość wstrzyknięć	Wynik posiewu z węzła podkolanowego
1	Micrococcus species	10^7	43	Enterococcus cloacae
2				Staphylococcus aureus
3				Staphylococcus chromogenes, Enterococcus cloacae
4				(-)
1	Staphylococcus simulans	10^7	43	Enterococcus cloacae
2				Escherichia coli
3				Staphylococcus aureus
4				Staphylococcus aureus
1	Staphylococcus capitis	10^7	43	Staphylococcus aureus
2				Staphylococcus aureus
3				Escherichia coli, Staphylococcus aureus
4				Staphylococcus aureus
1	Kontrola		0	(-)
2				Staphylococcus warneri
3				(-)
4				Staphylococcus hominis

Tabela IV.10. Wyniki hodowli limfocytów izolowanych z węzłów chłonnych po 43-krotnym podaniu szczepów bakterii hodowanych ze skóry łapy po pobudzeniu: fitohemaglutyniną (PHA), konkawalina A (Con A) i mitogenem szkarłatki (PWM). Wyniki średnie ± SD, n=4. (*) statystycznie istotne różnice w porównaniu z wartościami kontrolnymi (p<0.05, test t-Studenta).

		PHA μg/ml			Con A μg/ml			PWM μl/ml		
		4,5	18	90	1	2	5	1	5	10
Micrococcus species	x	5	39	47	59	74	77	33	34	36
	±SD	5	30	40	44	55	54	21	21	23
Staphylococcus simulans	x	3	36	60	60	88	75	56	43	44
	±SD	1	26	44	39	82	111	45	29	30
Staphylococcus capitis	x	11 (*)	40	45	57	62	67	51	57	57
	±SD	7	22	26	35	35	36	61	68	68
Kontrola	x	2	21	62	20	38	51	22	23	25
	±SD	2	33	101	31	60	81	36	35	39

Tabela IV.11. Wyniki hodowli limfocytów izolowanych z węzłów chłonnych po 43-krotnym podaniu podskórnie w łapę żywych bakterii po pobudzeniu tymi samymi atenuowanymi drobnoustrojami. Wartości indeksów \pm SD, n=4.
 (*) statystycznie znamienne różnice w porównaniu z wartościami kontrolnymi ($p < 0.05$, test t-Studenta).

	PHA 90 $\mu\text{g/ml}$		Micrococcus sp.		Staph.simulans		Staph.capitis		
	72h	7 dni	72 h	7 dni	72 h	7 dni	72 h	7 dni	
Micrococcus species	średnia	43,26	9,43	3,22	0,86	0,00		0,00	
	SD	64,69	10,98	2,84	0,21	0,00		0,00	
Staph. simulans	średnia	15,93	8,16	1,45	1,00	1,77	1,69	0,89	0,47 (*)
	SD	26,07	13,01	0,32	0,31	0,47	0,84	0,21	0,09
Staph. capitis	średnia	28,26	24,30 (*)	15,06	0,93	1,12	1,16	1,32	0,81
	SD	13,35	6,73	27,70	0,51	0,65	0,50	0,76	0,49
kontrola	średnia	14,63	6,91	5,92	1,15	5,63	1,18	5,83	0,97
	SD	12,51	6,26	13,11	0,30	13,19	0,52	13,54	0,42

VII. PIŚMIENICTWO

- ¹ Jakóbsiak M: Immunologia, Wyd.II, PZWL, Warszawa, 1996
- ² Rapaport SI: The extrinsic pathway inhibitor: a regulator of tissue factor - dependent blood coagulation. *Thrombosis and Hemostasis* 1991; 66: 6-15
- ³ Davie EW, Fujikawa K, Kiesel W: The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991; 30:10363-70
- ⁴ Furie B, Furie BC: The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988;53:505-518
- ⁵ Wachtfogel YT, DeLa Cadena RA, Coldman RW: Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thrombosis Research* 1993;72: 1-21
- ⁶ Collier BS: Platelets and thrombolytic therapy. *New England Journal of Medicine* 1990;322: 33-42
- ⁷ Robson SC, Saunders R, Purves LR, de Jager C, Corrigan A, Kirsch RE: Fibrin and fibrinogen degradation products with an intact D-domain C-terminal gamma chain inhibit an early step in accessory cell-dependent lymphocyte mitogenesis. *Blood* 1993;81:3006-14
- ⁸ Rajagopalan S, Pizzo SV: Characterization of murine peritoneal macrophage receptors for fibrin(ogen) degradation products. *Blood* 1986;67:1224-8
- ⁹ Klink M, Brzychcy M, Ziółkowski A, Świerzeko A, Sulowska Z, Cedzyński M, Tchórzewski H: The comparison of some biological activities of lipopolysaccharides obtained from smooth and rough *Proteus mirabilis* strains. *Acta Microbiologica Polonica* 1998;47:141-51
- ¹⁰ Wilhelm CR, Ristich J, Kormos RL, Wagner WR: Monocyte tissue factor expression and ongoing complement generation in ventricular assist device patients. *Annals of Thoracic Surgery* 1998;65:1071-6
- ¹¹ DiScipio RG: Formation and structure of the C5b-7 complex of the lytic pathway of complement. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:17087-94
- ¹² Rabiet MJ, Plantier JL, Dejana E: Thrombin - induced endothelial cell dysfunction. *British Medical Bulletin* 1994;50:936-45
- ¹³ Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E: Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 1996;16:488-96
- ¹⁴ Lum H, Malik AB: Regulation of vascular endothelial barrier function. *American Journal of Physiology* 1994;267:L223-41
- ¹⁵ Vuong PT, Malik AB, Nagpala PG, Lum H: Protein kinase C beta modulates thrombin-induced Ca²⁺ signaling and endothelial permeability increase. *Journal of Cellular Physiology* 1998;175:379-87
- ¹⁶ Sugama Y, Malik AB: Thrombin receptor 14-amino acid peptide mediates endothelial hyperadhesivity and neutrophil adhesion by P-selectin-dependent mechanism. *Circulation Research* 1992;71:1015-9
- ¹⁷ Del Vecchio PJ, Malik AB: Thrombin-induced neutrophil adhesion. *Progress in Clinical & Biological Research* 1989;308:101-12
- ¹⁸ Bizios R, Lai LC, Cooper JA, Del Vecchio PJ, Malik AB: Thrombin-induced adherence of neutrophils to cultured endothelial monolayers: increased endothelial adhesiveness. *Journal of Cellular Physiology* 1998;134:275-80
- ¹⁹ Zetter BR, Gospodarowicz D: The effect of thrombin on endothelial cell proliferation. W: Lundblad RL i wsp.: Chemistry and biology of thrombin.. Ann Arbor, Ann Arbor Science, 1977, str.551-60
- ²⁰ Noda-Heiny H, Sobel BE: Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor. *American Journal of Physiology* 1995;268:C1195-201
- ²¹ Mantovani A, Bussolino F, Dejana E: Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB Journal* 1992;6:2591-9
- ²² Bar-Schavit R, Benezra M, Sabbah V, Dejana E, Vlodavsky I, Wilner GD: Functional domains in thrombin outside the catalytic site: cellular interactions. W: Berliner LJ: Thrombin: structure and function. New York, Plenum Press 1992, str.315-350
- ²³ Stienberg J, Redin WR, Warner WS, Carney DH: The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thrombosis & Haemostasis* 1993;70:158-62
- ²⁴ Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, Mantovani A: Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *American Journal of Pathology* 1994;144:975-85

- ²⁵ Benezra M, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G, Bar-Shavit R: Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 1993;81:3324-31
- ²⁶ Muylle L, Beert JF, Mertens G, Bult H: Histamine synthesis by white cells during storage of platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 1998;74:193-7
- ²⁷ Poch B, Gansauge F, Gansauge S, Anger T, Nilsson U, Schoenberg MH, Beger HG: Release of histamine in whole blood by oxygen radicals: division between specific and unspecific processes. *Inflammation Research* 1996;45:428-33
- ²⁸ Feng D, Nagy JA, Hipp J, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM: Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores. *Journal of Physiology* 1997;504:747-61
- ²⁹ Michel CC, Kendall S: Differing effects of histamine and serotonin on microvascular permeability in anaesthetized rats. *Journal of Physiology* 1997;501:657-62
- ³⁰ Kissane JM, Anderson WAD - Anderson's pathology, Mosby, Nowy Jork, 1985
- ³¹ Maśliński S, Ryzewski J (red) : Patofizjologia, PZWL, Warszawa, 1992
- ³² Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD: Stimulation of repair in chronic non-healing, cutaneous ulcers using platelet derived wound healing formula. *Surgery Gynecology & Obstetrics* 1990;170:56-60
- ³³ Gorman PR: Prostaglandins, thromboxanes and prostacyclins. *International Review of Biological Chemistry* 1978;48:81
- ³⁴ Ross R, Benditt EP: Wound healing and collagen formation. I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in electron microscopy. *Journal of Biophysics and Biochemical Cytology* 1961;11:677-700
- ³⁵ Clark RA: Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1985;13:701-25
- ³⁶ Loike JD, el Khoury J, Cao L, Richards CP, Rascoff H, Mandeville JT, Maxfield FR, Silverstein SC: Fibrin regulates neutrophil migration in response to interleukin 8, leukotriene B4, tumor necrosis factor, and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Journal of Experimental Medicine* 1995;181:1763-72
- ³⁷ Lundgren-Akerlund E, Olofsson AM, Berger E, Arfors KE: CD11b/CD18-dependent polymorphonuclear leucocyte interaction with matrix proteins in adhesion and migration. *Scandinavian Journal of Immunology* 1993;37:569-74
- ³⁸ Bagglioni M, Dewald B, Moder B: Human chemokines: an update. *Annual Review of Immunology* 1997;15:675-705
- ³⁹ Rollins B: Chemokines. *Blood* 1997;90, 909-928
- ⁴⁰ Betz P: Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. *International Journal of Legal Medicine* 1994;107:60-8
- ⁴¹ Saban MR, Saban R, Bjorling D, Haak-Frendscho M: Involvement of leukotrienes, TNF-alpha, and the LFA-1/ICAM-1 interaction in substance P-induced granulocyte infiltration. *Journal of Leukocyte Biology* 1997;61:445-51
- ⁴² Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ: Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *American Journal of Pathology* 1998;153:587-98
- ⁴³ Pandit AS, Feldman DS., Caulfield J, Thompson A: Stimulation of angiogenesis by FGF-1 delivered through a modified fibrin scaffold. *Growth Factors* 1998;15:113-23
- ⁴⁴ Pandit A, Ashar R, Feldman D, Thompson A: Investigation of acidic fibroblast growth factor delivered through a collagen scaffold for the treatment of full-thickness skin defects in a rabbit model. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1998;101:766-75
- ⁴⁵ Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W: Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101:40-50
- ⁴⁶ Wulfing C, Davis MM: A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 1998;282:2266-9
- ⁴⁷ Kelleher D, Murphy A, Feighery C, Casey EB: Leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and CD44 are signalling molecules for cytoskeleton-dependent morphological changes in activated T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1995;58:539-46
- ⁴⁸ Witte MB, Barbul A: General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America* 1997;77:509-528,
- ⁴⁹ Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte - endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101
- ⁵⁰ DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM: MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101:1693-8

- ⁵¹ Brown GC, Foxwell N, Moncada S: Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages. *FEBS Letters* 1998;439:321-4
- ⁵² Portera CA, Love EJ, Memore L, Zhang L, Muller A, Browder W, Williams DL: Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *American Surgeon* 1997;63:125-31
- ⁵³ Wu L, Yu YL, Galiano RD, Roth SI, Mustoe TA: Macrophage colony-stimulating factor accelerates wound healing and upregulates TGF-beta1 mRNA levels through tissue macrophages. *Journal of Surgical Research* 1997;72(2):162-9
- ⁵⁴ Efron JE, Frankel HE, Lazarou S.A., Wasserkrug HL, Barbul A: Wound healing and T-lymphocytes. *Journal of Surgical Research* 1990;48:460-463
- ⁵⁵ Yang J, Torio A, Donoff RB, Gallagher GT, Egan R, Weller PF, Wong DT: Depletion of eosinophil infiltration by anti-IL-5 monoclonal antibody (TRFK-5) accelerates open skin wound epithelial closure. *American Journal of Pathology* 1997;151:813-9
- ⁵⁶ Wershil BK, Mekori YA, Murakami T, Galli SJ: 125I-fibrin deposition in IgE-dependent immediate hypersensitivity reactions in mouse skin: demonstration of the role of mast cells using mast cell-deficient mice locally reconstituted with cultured mast cells. *Journal of Immunology* 1987;139:2605-2614
- ⁵⁷ Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordon RP, Paul WE: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross linkage of Fc epsilon RI or calcium ionophores. *Nature* 1989;339:64-67
- ⁵⁸ Burd PR, Rogers HW, Gordon JR: Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 1989;170:245-257
- ⁵⁹ Tylman D, Dziak A: *Traumatologia Narządu ruchu*, PZWL, Warszawa 1985
- ⁶⁰ Krompetscher G: *Praxis der Marknagelung*. Stuttgart, Niemcy 1962
- ⁶¹ Buckwalter JA, Cruess R: Healing of musculoskeletal tissues. W: Rockwood CA, Green DP, Bucholz RW: *Rockwood and Green's fractures in adults*. Lippincott, Philadelphia 1991
- ⁶² Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C: Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1993;64:553-6
- ⁶³ Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG: Regulation of human bone-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *Journal of Clinical Investigation* 1995;95:881-87
- ⁶⁴ Massague J: The transforming growth factor-beta family. *Annual Review of Cell Biology* 1990;6:597-606
- ⁶⁵ Seyedin SM, Segarini PR, Rosen DM, Thompson AY, Bentz H, Graycar J: Cartilage-inducing factor -B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor - beta. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262:1946-50
- ⁶⁶ Lawrence DA, Pircher R, Jullien P: Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1985;133,1026-34
- ⁶⁷ Roberts AB, Sporn MB: The transforming growth factors. *Handbook of Experimental Pharmacology* 1990;95,419-58
- ⁶⁸ Wakefield LM, Smith DM, Flaunders KC, Sporn MB: Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sentence. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:7646-54
- ⁶⁹ Mossaue J: The transforming growth factor-beta family. *Annual Review of Cell Biology* 1990;6:597-641
- ⁷⁰ Wahl S: TGF-beta in inflammation. A course and cure. *Journal of Clinical Immunology* 1992;12:1-14
- ⁷¹ Border WA, Noble NA: Transforming Growth Factor -beta in tissue fibrosis., *New England Journal of Medicine* 1994;10:1286-92
- ⁷² Iwasaki M, Nakahara H, Nakata K, Nakase T, Kimura T, Ono K: Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1995;77-A:4,543-54
- ⁷³ Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR: Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *Journal of Clinical Investigations* 1988;82:680-8
- ⁷⁴ Beck LS, Ammann AJ, Aufdemorte TB, Deguzman L, Xu Y, Lee WP, McFatrige LA, Chen TL: In vivo induction of bone recombinant human transforming growth factor beta. *Journal of Bone & Mineral Research* 1991;6:961-8
- ⁷⁵ Beck LS, Amento EP, Xu Y, Deguzman L, Lee WP, Nguyen T, Gillet NA: TGF-beta induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rh-TGF-beta. *Journal of Bone & Mineral Research* 1993;8,753-61
- ⁷⁶ Centrella M, McCarthy TL, Canalis E: Skeletal tissue and transforming growth factor - beta. *FASEB Journal* 1988;2:3066-72

- ⁷⁷ Carrington JL, Roberts AB, Flanders KC, Roche NS, Reddi AH: Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor beta during endochondral bone development. *Journal of Cell Biology* 1988;107:1969-75
- ⁷⁸ Bentz H, Nathan RM, Rosen DM, Armstrong RM, Thompson AY, Segarini PR, Mathews MC, Dasch JR, Piez KA, Seyedin SM: Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:20805-10
- ⁷⁹ Hulth A, Johnell O, Henricson A: The implantation of demineralized fracture matrix yields more bone formation than does intact matrix. *Clinical Orthopedics & Related Research* 1988;234:235-39
- ⁸⁰ Urist MR, Earnest F, Kimball KM, Di Julio TP, Iwata H: Bone morphogenesis in implants of residues of radioisotope labelled bone matrix. *Calcified Tissue Research* 1974;15:269-86
- ⁸¹ Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Wood WI, Reddi AH: Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone formation. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:13377-84
- ⁸² Ozkanyak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H: OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO Journal* 1990;9:2085-90
- ⁸³ Cook SD, Wolfe MW, Salked SL, Ruegger DC: Effect of recombinant human Osteogenic Protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1995;77-A:734-50
- ⁸⁴ Canalis E, McCarthy T, Centrella M: Growth factors and the regulation of bone remodeling. *Journal of Clinical Investigations* 1988;81:277-85
- ⁸⁵ Klagsbrun M: Regulators of angiogenesis. *Annual Review of Physiology* 1991;53:217-39
- ⁸⁶ Burgess WH, Maciag T: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annual Review of Biochemistry* 1989;58:575-606
- ⁸⁷ Ortega S, Schaeffer MT, Soderman D, DiSalvo D, Linemeyer DL, Gimenes-Gallego G, Thomas KA: Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability and heparin dependence of aFGF. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:5842-6
- ⁸⁸ Liu HM, Chen HH: C-fos protein expression and ischemic changes in neurons vulnerable to ischemia/hypoxia, correlated with basic fibroblast growth factor immunoreactivity. *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology* 1994;53:598-605
- ⁸⁹ Gospodarowicz D, Cheng J: Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *Journal of Cellular Physiology* 1986;128:475-84
- ⁹⁰ Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlstrom A, Skottner A, Isaksson OG: Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* 1986;233:571-4
- ⁹¹ Miltyk W, Karna E, Wolczynski S, Pałka J: Insulin-like growth factor I-dependent regulation of prolidase activity in cultured human skin fibroblasts. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1998;189:177-83
- ⁹² Heldin CH, Westermark B: Platelet-derived growth factor: Three isoforms and two receptor types. *Trends in Genetics* 1989;5:108-11
- ⁹³ Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986;46:155-69
- ⁹⁴ Tashjian AH, Hohmann EL, Antoniades HN, Levine L: Platelet-derived growth factor stimulates bone resorption via prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology* 1982;111:118-24
- ⁹⁵ Floege J, Topley N, Wessel K, Kaefer V, Radeke H, Hoppe J, Kishimoto T, Resch K: Monokines and platelet-derived growth factor modulate prostanoid production in growth arrested, human mesangial cells. *Kidney International* 1990;37:859-69
- ⁹⁶ Jendraschak E, Kaminski WE, Kiefl R, von Schacky C: IGF-1, PDGF and CD18 are adherence-responsive genes: regulation during monocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1396:320-35
- ⁹⁷ Manolagas SC, Jilka RL: Bone marrow, cytokines and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *New England Journal of Medicine* 1995;332:305-11
- ⁹⁸ Gowen M, Mundy GR: Actions of recombinant Interleukin-1, interleukin-2 and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *Journal of Immunology* 1986;136:2478-82
- ⁹⁹ Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte T, Bonewald L, Mundy GR: Infusions of recombinant human interleukins 1 alpha and 1 beta cause hypercalcemia in normal mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1988;85:5235-39
- ¹⁰⁰ Lieschke GJ, Burgess AW: Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *New England Journal of Medicine* 1992;327:2835
- ¹⁰¹ Murray LJ, Luens KM, Estrada MF, Bruno E, Hoffman R, Cohen RL, Ashby MA, Vadhan-Raj S: Thrombopoietin mobilizes CD34+ cell subsets into peripheral blood and expands multilineage progenitors in bone marrow of cancer patients with normal hematopoiesis. *Experimental Hematology* 1998;26:207-16

- ¹⁰² McLafferty RB, Moneta GL, Passman MA, Brant BM, Taylor LM, Porter JM: Late clinical and hemodynamic sequelae of isolated calf vein thrombosis. *Journal of Vascular Surgery* 1998;27:50-6
- ¹⁰³ Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, Kadell AM, Wróbleski SK, Burdick MD, Schmidt R, Kunkel SL, Greenfield LJ: Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 1995;15:258-68
- ¹⁰⁴ Pappas PJ, DeFouw DO, Venezio LM, Gorti R, Padberg FT, Silva MB, Goldberg MC, Duran WN, Hobson RW: Morphometric assesment of the dermal microcirculation in patients with chronic venous insufficiency. *Journal of Vascular Surgery* 1997;26:784-95
- ¹⁰⁵ Lagattolla NR, Stacey MC, Burnand KG, Gaffney PG: Growth factors, tissue urokinase - type plasminogen activators in venous ulcers. *Annales de Cardiologie et d'Angiologie* 1995;44:299-303
- ¹⁰⁶ Sudeck P: Uber die akute entzündiche Knochenatropnie. *Archives Klinisches Chirurgie* 1890,62:147-156
- ¹⁰⁷ Shah N, Weinstein A: Reflex sympathetic dystrophy syndrome following air-bag inflation. *New England Journal of Medicine* 1997;337(8):574
- ¹⁰⁸ van der Laan L, Veldman PH, Goris RJ: Severe complications of reflex sympathetic dystrophy: infection, ulcers, chronic edema, dystonia, and myoclonus. *Archives of Physical Medicine & Rehabilitation* 1998;79(4):424-9
- ¹⁰⁹ Żyluk A: The natural history of post-traumatic reflex sympathetic dystrophy. *Journal of Hand Surgery - British Volume* 1998;23:20-3
- ¹¹⁰ Żyluk A.: Rys historyczny algodystrofii: część II. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska* 1997;62:353-8
- ¹¹¹ Tylman D, Dziak A: *Traumatologia narządu ruchu, Tom 1, PZWL, Warszawa* 1985
- ¹¹² Bossanyi A, Gurin J, Vizkelety T: Az also vehtag Sudeck-syndromajanak kezelese. [Treatment of Sudeck's syndrome of the lower extremities]. *Orvosi Hetilap* 1987;128:2301-5
- ¹¹³ Żyluk A: Współczesne poglądy na leczenie dystrofii Sudecka. *Polski Przegląd Chirurgiczny* 1994,66;9:973-8
- ¹¹⁴ Arlet J, Laroche M, Soler R, Thiechart M, Pieraggi MT, Mazieres B: Histopathology of the vessels of the femoral heads in specimens of osteonecrosis, osteoarthritis and algodystrophy. *Clinical Rheumatology* 1993;12:162-5
- ¹¹⁵ Bruce NA: Uber die Beziehung der sensiblen Nervenendigungen zum Entzündungsvorgang. *Archives Experimental Pathologie und Pharmakologie* 1910;63:424-433
- ¹¹⁶ Kenins P: Identification of the unmyelinated sensory nerves which evoke plasma extravasation in response to antidromic stimulation. *Neuroscience Letters* 1981;25:137-141
- ¹¹⁷ Holzer P: Local effector function of capsaicin - sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene - related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988;24:739-768
- ¹¹⁸ Schaffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK: Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair?. *Archives of Surgery*. 1988;133:1107-16
- ¹¹⁹ Pernow B: Substance P. *Pharmacological Review* 1983;35:85-141
- ¹²⁰ Bolton T, Clapp L: Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 1986;87:713-715
- ¹²¹ Hokfelt T, Kellerth J, Nilsson G, Pernow B: Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurones. *Science* 1975;190:889-890
- ¹²² Devillier P, Regoli D, Asseraf A, Descours B, Marsac J, Renoux M: Histamine release and local responses of rat and human skin to substance P and other mammalian tachykinins. *Pharmacology* 1986;32:340-347
- ¹²³ Ansel JC, Kaynard AH, Armstrong CA, Olerud J, Bunnett N, Payan D: Skin-nervous system interactions. *Journal of Investigative Dermatology* 1996;106:198-204
- ¹²⁴ Peretti M, Ahluwalia A, Flower RJ, Manzini S: Endogenous tachykinins play a pivotal role in IL-1-induced neutrophil accumulation: involvement of NK-1 receptors. *Immunology* 1993;80:73-77
- ¹²⁵ Carolan EJ, Casale TB: Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1993;92:589-598
- ¹²⁶ Hartung H-P, Wolters K, Toyka KV: Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. *Journal of Immunology* 1986;136:3856-3863
- ¹²⁷ Lotz M, Vaughan JH, Carson DA: Effects of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988;241:1218-1220
- ¹²⁸ Rameshwar P, Ganea D, Gascon P: Induction of IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by substance P in bone marrow cells is partially mediated through the release of IL-1 and IL-6. *Journal of Immunology* 1994;152:4044-4054

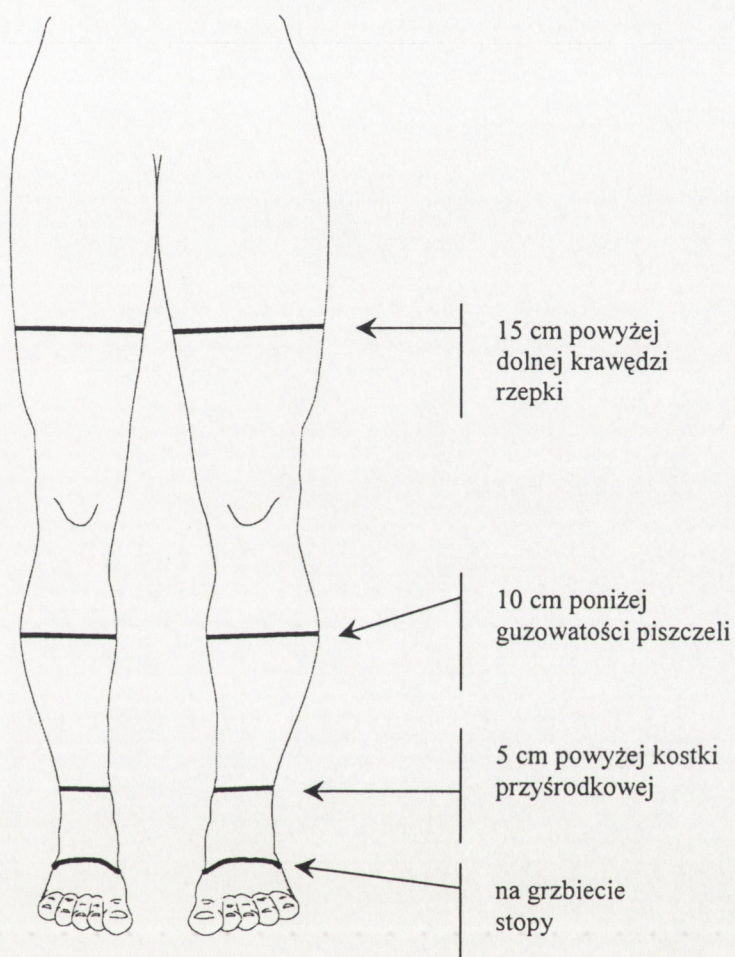
- ¹²⁹ Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J: Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *Journal of Immunology* 1986;136:152-156
- ¹³⁰ Goetzl EJ, Chernov T, Renold F, Payan DG: Neuropeptide regulation of the expression of immediate hypersensitivity. *Journal of Immunology* 1985;135:S802-S805
- ¹³¹ Ratzlaff RE, Cavanaugh VJ, Miller GW, Oakes SG: Evidence of a neurogenic component during IgE-mediated inflammation in mouse skin. *Journal of Neuroimmunology* 1992;41:89-96
- ¹³² Zawieja DC: Lymphatic microcirculation. *Microcirculation* 1996;3:241-3
- ¹³³ Kapas S, Clark AJ: Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1995;217:832-838
- ¹³⁴ Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985;313:54-56
- ¹³⁵ Louis SM, Jamieson A, Russell NJW, Dockray GJ: The role of substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. *Neuroscience* 1989;32:581-586
- ¹³⁶ Fox FE, Kubin M, Cassin M: Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *Journal of Investigative Dermatology* 1997;108:43-4
- ¹³⁷ Kittner C, Kroger J, Rohrbeck R, Parnitzke B, Decker S, Lakner V: Lymphabstromszintigraphie bei einem artefiziellen Oedem des Unterschenkels. *Nuklearmedizin*, 1994;33(6):268-70
- ¹³⁸ Douglas HM: Increased lymphoscintigraphic flow pattern in the lower extremity under evaluation for lymphedema. *Mayo Clinic Proceedings*, 1997;72:423-9
- ¹³⁹ Szczyński G, Veihelmann A, Nolte D, Leiderer R, Schutze E, Olszewski WL, Messmer K: Influence of mechanical trauma on lymphatic outflow from the limb. *Progress in Lymphology*, 1998,31(suppl):181-3
- ¹⁴⁰ Kaindl F, Mannheimer E: Lymphgefäßveränderungen nach lokaler Schädigung." *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 1970;327: 162-5
- ¹⁴¹ Czepelenko GV, Limfografia pri posttraumaticzieskich otiekach golieni. *Vestnik Rentgenologii i Radiologii* 1986;3:5-61
- ¹⁴² Czepelenko GV: Kliniko - limfograficestaja diagnostika posstrawmaticieskowo otieka pri zamieszczenii defektow kostiej. *Vestnik Khirurgii Imeni i i Grekova* 1987;138:36-8.
- ¹⁴³ Czepelenko, GV, Sveshnikov AA, Mukhamedzhanov I: Rientgenologiczieskaja ocenka naryszenia toka limfy pri posttraumaticzieskich otiekach niznich koniecznostiej. *Vestnik Rentgenologii i Radiologii* 1985;6:60-5
- ¹⁴⁴ Georgi M, Georgi P, Becker J: Zur Frage der Alterations von Lymphgefäßen bei frischen Frakturen. *Röntgen Blätter* 1972;25:42-4
- ¹⁴⁵ Guyton AC: *Textbook of medical physiology*, Saunders, Philadelphia, 1966
- ¹⁴⁶ Johnston MG: Effects of chemical mediators and drugs on lymphatic vessel contractility and lymph flow. In: Johnston MG. (red.) *Experimental biology of the lymphatic circulation*, Elsevier, 1985, str.93-104
- ¹⁴⁷ Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G, Galkowska H, Grzelak I, Zaleska M: Lymph cytokines in obstructive lymphedema – a sign of chronic inflammatory reaction. *Progress in Lymphology*, 1998;31 (suppl):126-7
- ¹⁴⁸ Johnston MG, Elias R: The regulation of lymphatic pumping. *Lymphology* 1987;20:215-8
- ¹⁴⁹ Olszewski WL, Jamal S, Tripathi FM, Manokaran G: Tissue fluid and lymph pressure flow in patients with obstructive lymphedema. *Progress in Lymphology*, 1998;31 (suppl):186-194
- ¹⁵⁰ Olszewski WL, Engeset A: Intrinsic contractility of prenodal lymph vessels and lymph flow in human leg. *American Journal of Physiology*. 1980;239:H775-83
- ¹⁵¹ Guyton AC: Intestinal fluid pressure: II. Pressure – volume curves of interstitial spaces. *Circulation Research* 1965;16:452
- ¹⁵² Reynders P, Becker JH, Broos P: Osteogenic ability of free periosteal autografts in tibial fractures with severe soft tissue damage: an experimental study. *Journal of Orthopaedic Trauma* 1999;13:121-8
- ¹⁵³ Baltadjiev G: Reaction of the periosteum to subperiosteal implantation of a foreign body. *Folia Medica (Plovdiv)* 1996;38:55-61
- ¹⁵⁴ Kuebel MA, Yeager VL, Taylor JJ: Effect of phenytoin and/or beta-aminopropionitrile on a surgically induced periosteal wound. *Journal of Experimental Pathology* 1985;2:99-109
- ¹⁵⁵ Takeuchi A, Miyamoto T, Hayashi H, Tomita M, Onozaki K: Purification and characterization of a human erythrocyte-derived growth factor with a wide target cell spectrum. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:24935-40
- ¹⁵⁶ Takeuchi A, Miyamoto T, Yamaji K, Masuho Y, Hayashi M, Hayashi H, Onozaki K: A human erythrocyte-derived growth-promoting factor with a wide target cell spectrum: identification as catalase. *Cancer Research*, 1995;55:1586-9

- ¹⁵⁷ Aitken RJ, Mills C, Immelman EJ: The postphlebotic syndrome following shaft fractures of the leg. A significant late complication. *Journal of Bone & Joint Surgery* 1987;69-B:775-8
- ¹⁵⁸ Gleis GE, Seligson D: Diagnosis and treatment of complications. *Thromboembolic disorders*. W: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG: *Skeletal Trauma*. Saunders, Philadelphia 1992
- ¹⁵⁹ Haake DA, Berkman SA: Venous thromboembolic disease after hip surgery. Risk factors, prophylaxis, and diagnosis. *Clinical Orthopedics* 1989;242:212-231
- ¹⁶⁰ Szczepański M: *Zakrzepica żył głębokich i jej powikłania*. PZWL, Warszawa 1989
- ¹⁶¹ Strandness DE, Langlois Y, Cramer M, Randlett A, Thiele BL: Long-term sequelae of acute venous thrombosis. *Journal of American Medical Association* 1983;250:1289-1292
- ¹⁶² Francis CW, Ricotta JJ, Evarts CM, Marder VJ: Long-term clinical observations and venous functional abnormalities after asymptomatic venous thrombosis following total hip or knee arthroplasty. *Clinical Orthopedics* 1988;232: 271-278
- ¹⁶³ Warwick D, Perez J, Vickery C, Bannister G: Does total hip arthroplasty predispose to chronic venous insufficiency? *Journal of Arthroplasty* 1996;11:529-33
- ¹⁶⁴ Biguzzi E, Mozzi E, Alatri A, Taioli E, Moia M, Mannucci PM: The post-thrombotic syndrome in young women: retrospective evaluation of prognostic factors. *Thrombosis & Haemostasis* 1998;80:575-7
- ¹⁶⁵ Janssen MC, Haenen JH, van Asten WN, Wollersheim H, Heijstraten FM, de Rooij MJ, Thien T: Clinical and haemodynamic sequelae of deep venous thrombosis: retrospective evaluation after 7-13 years. *Clinical Science* 1997;93:7-12
- ¹⁶⁶ Masson C, Audran M, Pascaretti C, Namour A, Saumet JL, Basle MF, Legrand E, Bregeon C, Renier JC: Further vascular, bone and autonomic investigations in algodystrophy. *Acta Orthopaedica Belgica* 1998;64:77-87
- ¹⁶⁷ Berthelot JM, Glemarec J, Guillot P, Maugars Y, Prost A: Algodystrophy (reflex sympathetic dystrophy syndrome) and causalgia: novel concepts regarding the nosology, pathophysiology, and pathogenesis of complex regional pain syndromes. Is the sympathetic hyperactivity hypothesis wrong? *Revue Du Rhumatisme* 1997;64:481-91
- ¹⁶⁸ Żyluk A: W sprawie trzyfazowej ewolucji algodystrofii pourazowej. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska* 1998;63:479-86
- ¹⁶⁹ Kurvers HA: Reflex sympathetic dystrophy: facts and hypotheses. *Vascular Medicine* 1998;3:207-14
- ¹⁷⁰ Jaeger SH, Singer DI, Whitenack SH, Mandel S: Nerve injury complications. Management of neurogenic pain syndromes. *Hand Clinics* 1986;2:217-34
- ¹⁷¹ Drayson MT, Ford WI: Afferent lymph and lymph borne cells: their influence on lymph node function. *Immunobiology* 1984;168:362-8
- ¹⁷² Kelso A: Cytokines: principles and prospects. *Immunology & Cell Biology* 1998;76:300-317
- ¹⁷³ Le DT, Toneff TW, Witte MH, Rappaport SI: Hemostatic factors in rabbit limb lymph: relationship to mechanisms regulating extravascular coagulation. *American Journal of Physiology* 1998;274:H769-776
- ¹⁷⁴ Engeset A, Sokołowski J, Olszewski WL: Variation in output of leukocytes and erythrocytes in human peripheral lymph during rest and activity. *Lymphology* 1977;10:198-203
- ¹⁷⁵ Olszewski WL, Grzelak I, Ziolkowska A, Engeset A: Immune cell traffic from blood through the normal human skin to lymphatics. *Clinics in Dermatology* 1995;13:473-83
- ¹⁷⁶ Olszewski WL, Grzelak I, Ziolkowska A, Engeset A: Effect of local hyperthermia on lymph immune cells and lymphokines of normal human skin. *Journal of Surgical Oncology* 1989;41:109-16
- ¹⁷⁷ Sokołowski J, Jacobsen E, Johannessen JV: Cells in peripheral leg lymph of normal men. *American Journal of Physiology* 1977;232:H608-12
- ¹⁷⁸ Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Grassi F, Ferruzzi A, Gualtieri G, Facchini A: Chemokine expression by subchondral bone marrow stromal cells isolated from osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) patients. *Clinical & Experimental Immunology* 1999;116:371-8
- ¹⁷⁹ Schwaighofer H, Kernan NA, O'Reilly RJ, Brankova J, Nachbaur D, Herold M, Eibl B, Niederwieser D: Serum levels of cytokines and secondary messages after T-cell-depleted and non-T-cell-depleted bone marrow transplantation: influence of conditioning and hematopoietic reconstitution. *Transplantation* 1996;62:947-53
- ¹⁸⁰ Grzelak I, Olszewski WL, Rowiński W: The effect of moderate operative trauma on the blood lymphocyte reactivity--immunomodulatory effect of interleukin-2. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1991;39:133-8
- ¹⁸¹ Chan J, Leenen PJ, Bertonecello I, Nishikawa SI, Hamilton JA: Macrophage lineage cells in inflammation: characterization by colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-Fms), ER-MP58, and ER-MP20 (Ly-6C) expression. *Blood* 1998;92:1423-31
- ¹⁸² Adkins D, Goodgold H, Hendershott L, Johnston M, Cravens D, Spitzer G: Indium-labeled white blood cells

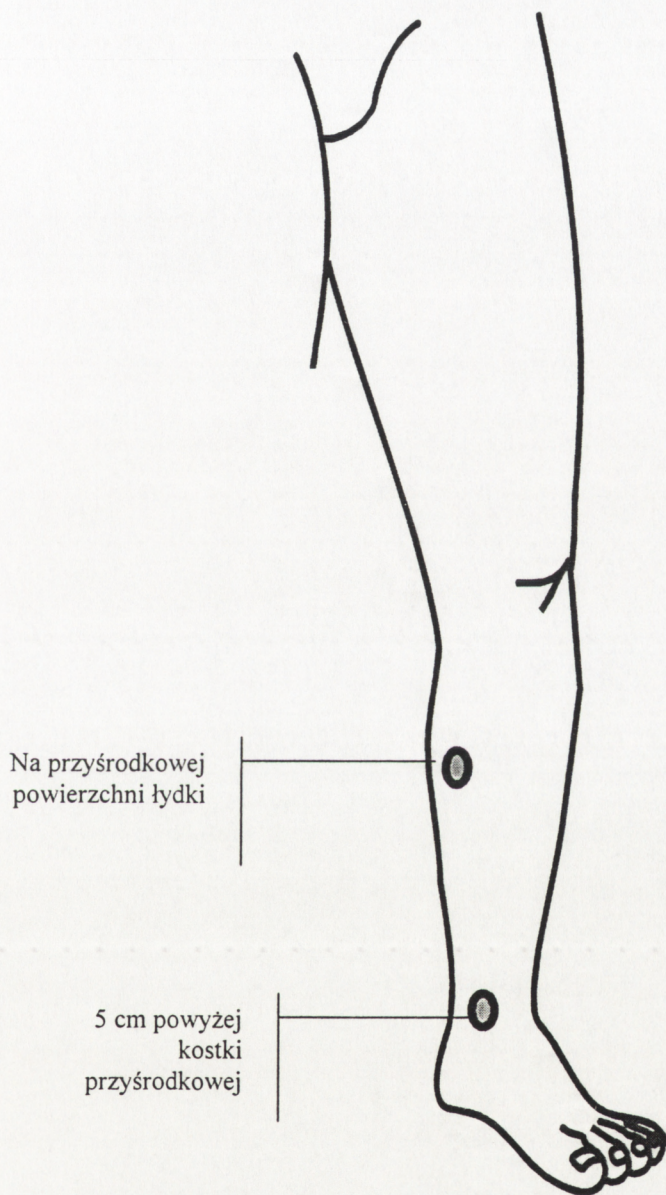
apheresed from donors receiving G-CSF localize to sites of inflammation when infused into allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* 1997;19:809-12

¹⁸³ Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G, Pani S, Kumaraswami V, Kubicka U, Łukomska B, Dworczyński A, Swoboda E, Meisel-Mikołajczyk F: Bacteriologic studies of skin, tissue fluid, lymph, and lymph nodes in patients with filarial lymphedema. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 1997;57:7-15

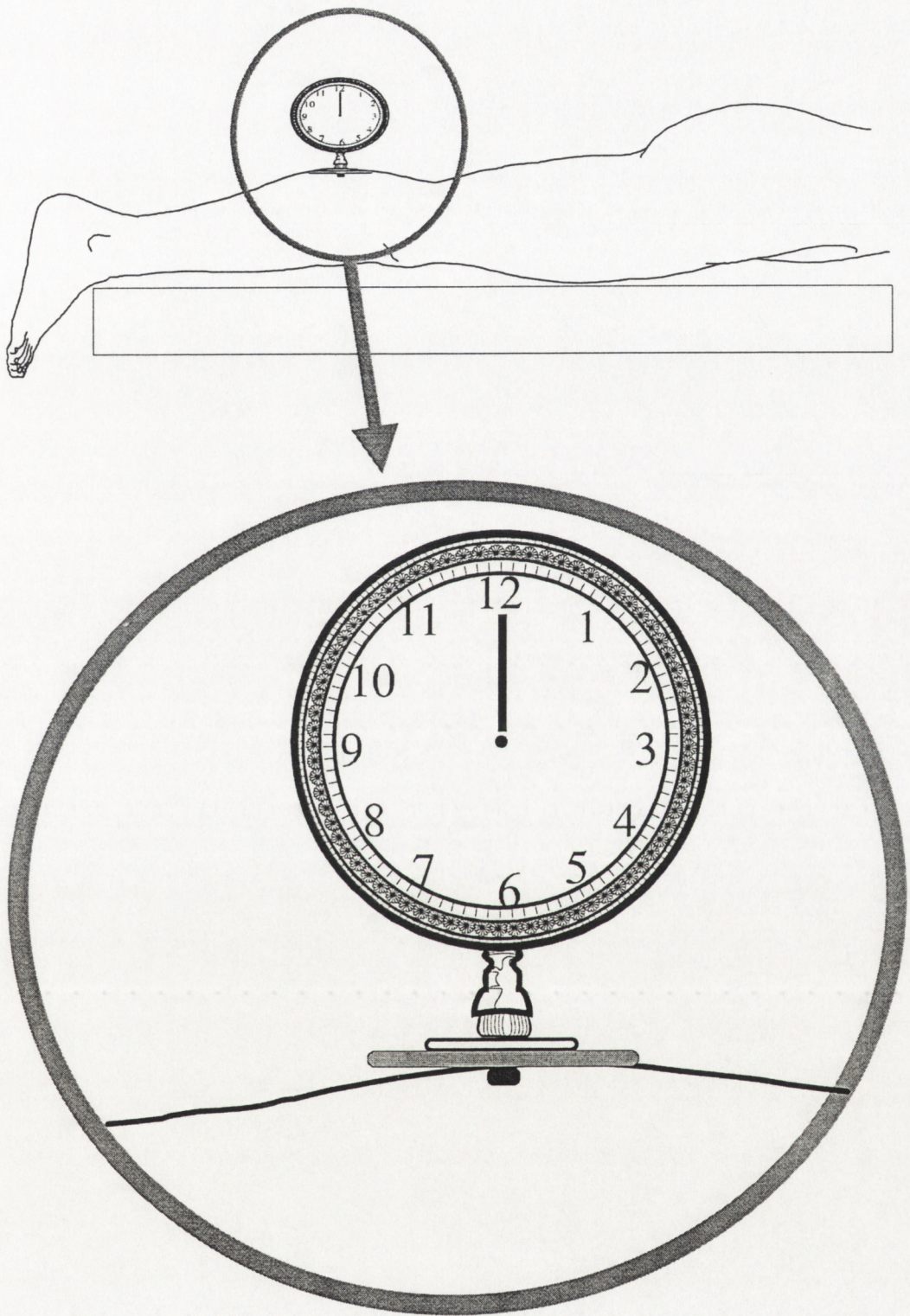
¹⁸⁴ Leak LV, Burk JF: Studies on the permeability of lymphatic capillaries during inflammation. *Anatomical Records* 1965;151:489-91



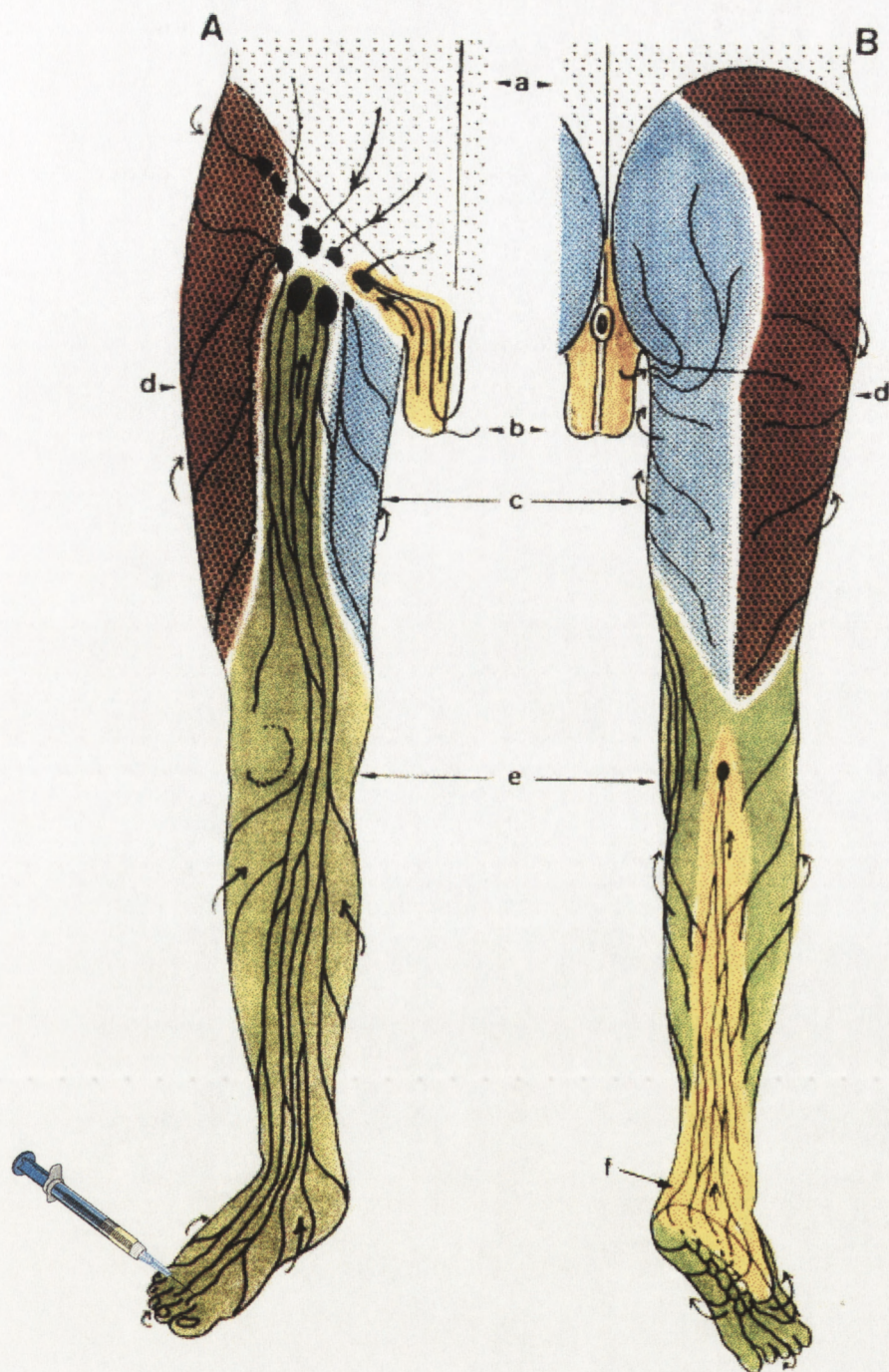
Ryc.III.1. Poziomy wykonywania pomiarów obwodów kończyn.



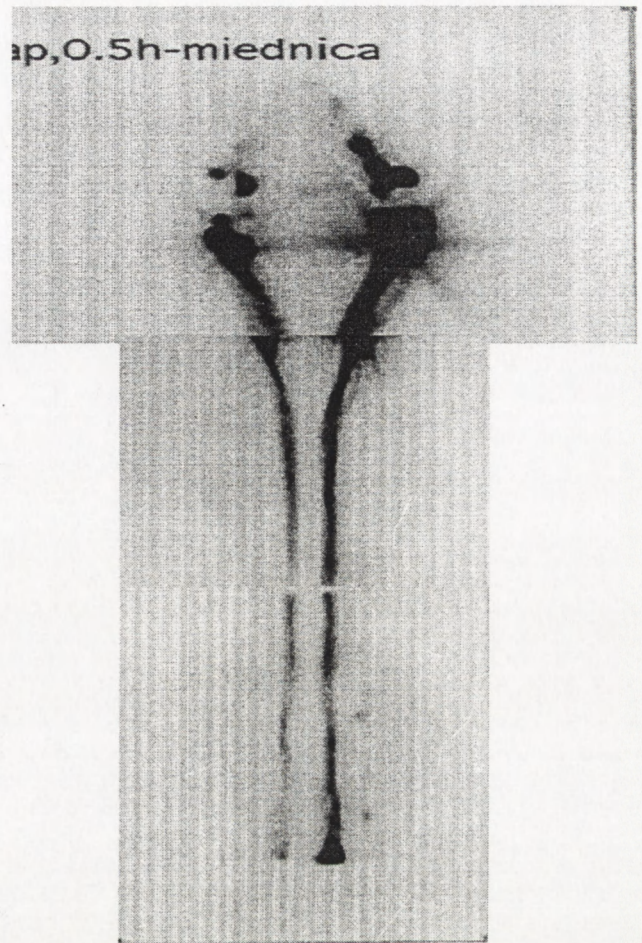
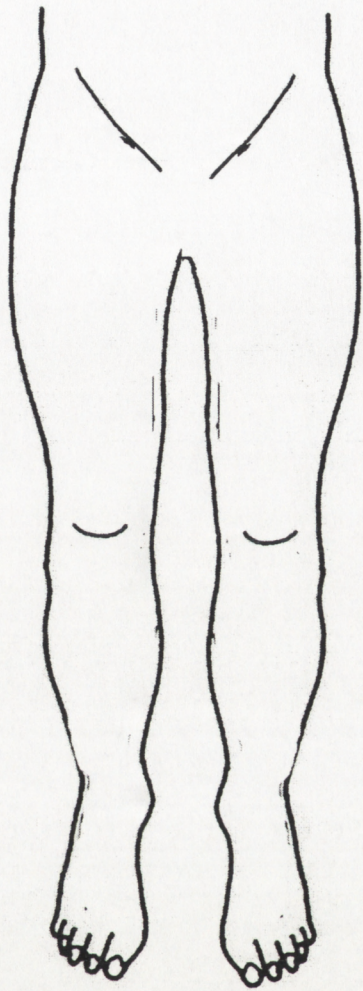
Ryc.III.2. Miejsca wykonywanych pomiarów temperatury skóry.



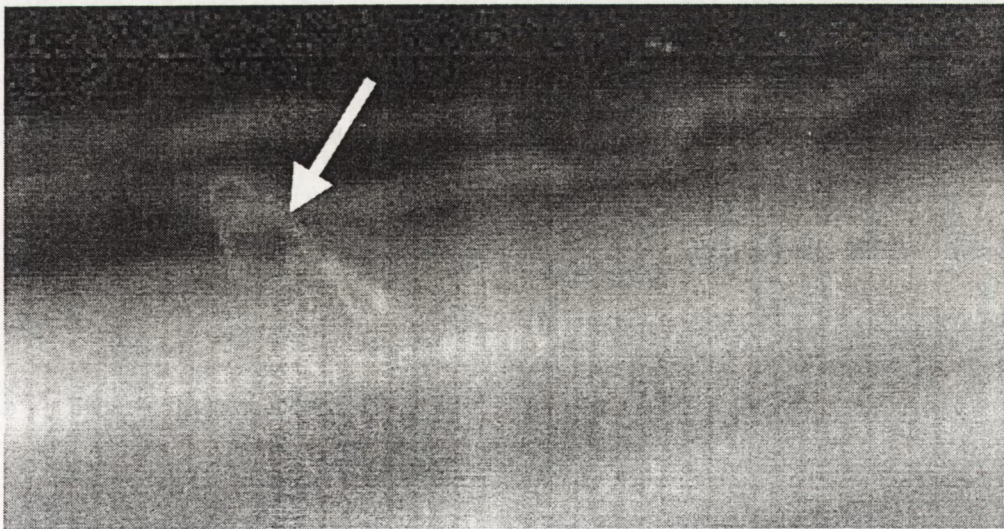
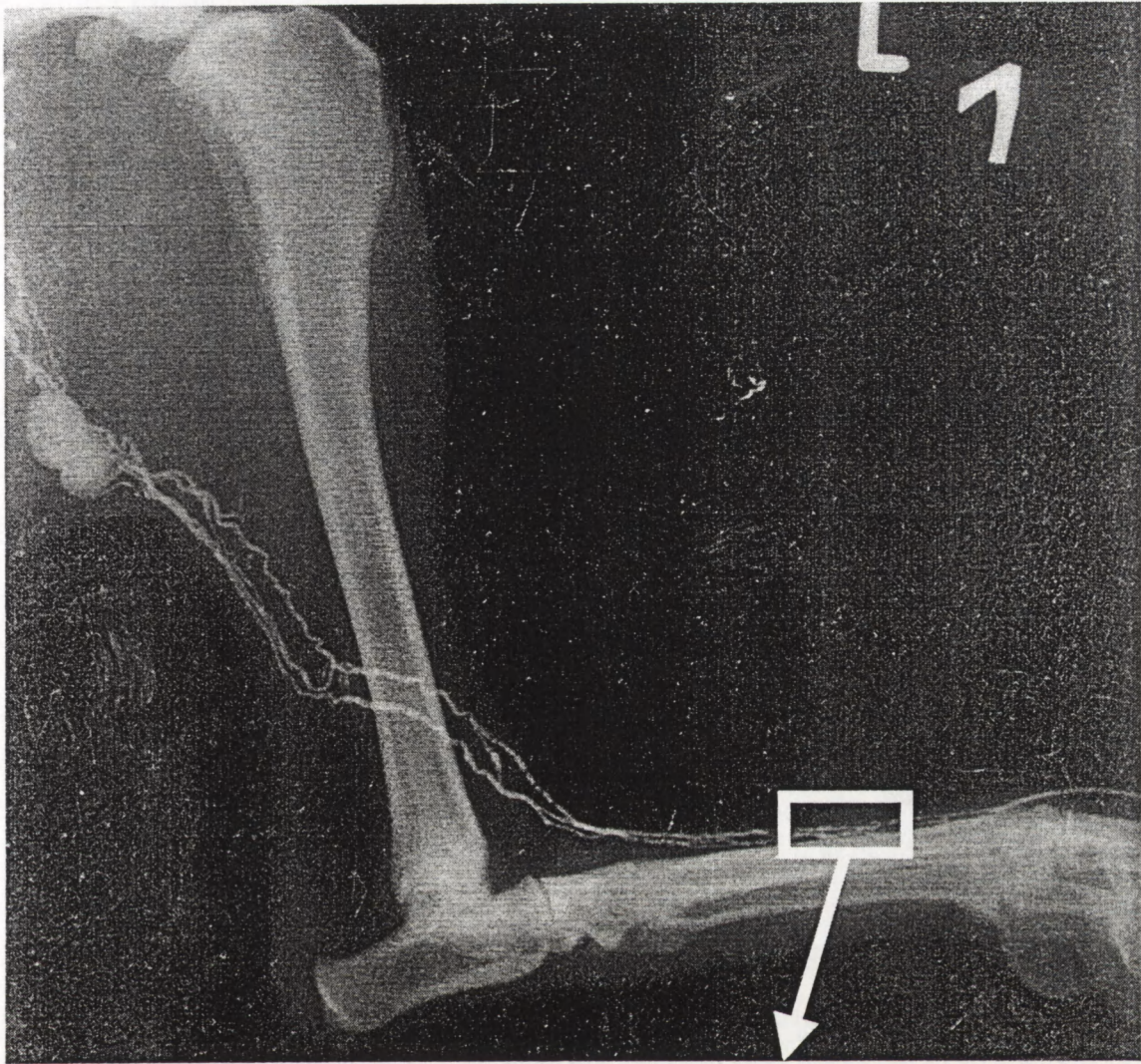
Ryc.III.3. Technika wykonywania pomiarów tonometrii tkankowej. Pomiar wykonywany przy użyciu tonometru mechanicznego z ciężarkami 40, 110 i 180 g w tkankach miękkich łydki w ułożeniu chorego na brzuchu ze stopami swobodnie zwisającymi.



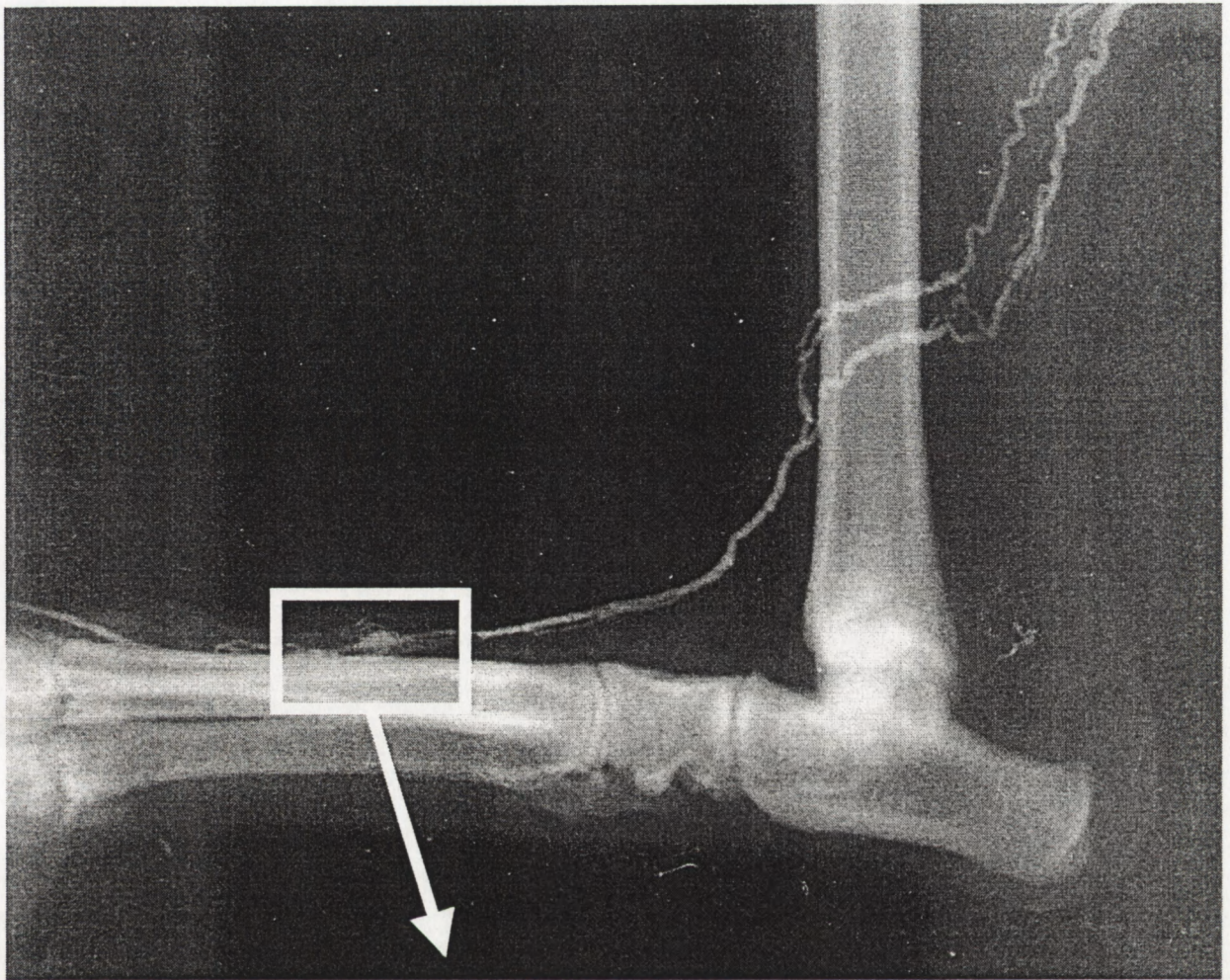
Ryc.III.4. Anatomia układu chłonnego kończyny dolnej człowieka. Widok od przodu (a) i od tyłu (b) (z: Kubik S: Atlas of the lymphatics of the lower limbs. Serviere International, Francja 1998) i miejsce wstrzykiwania ^{99m}Tc -Nanocolu podczas wykonywania limfoscintygrafii.



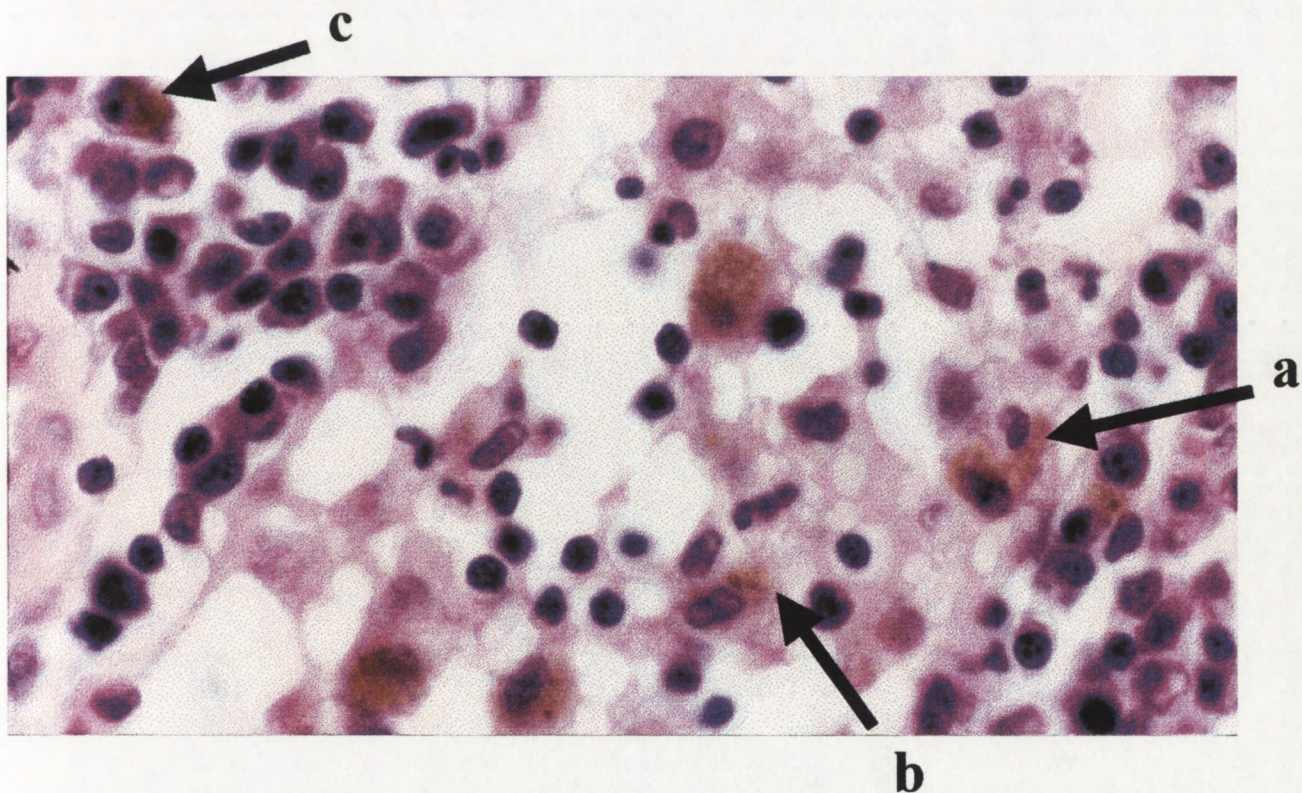
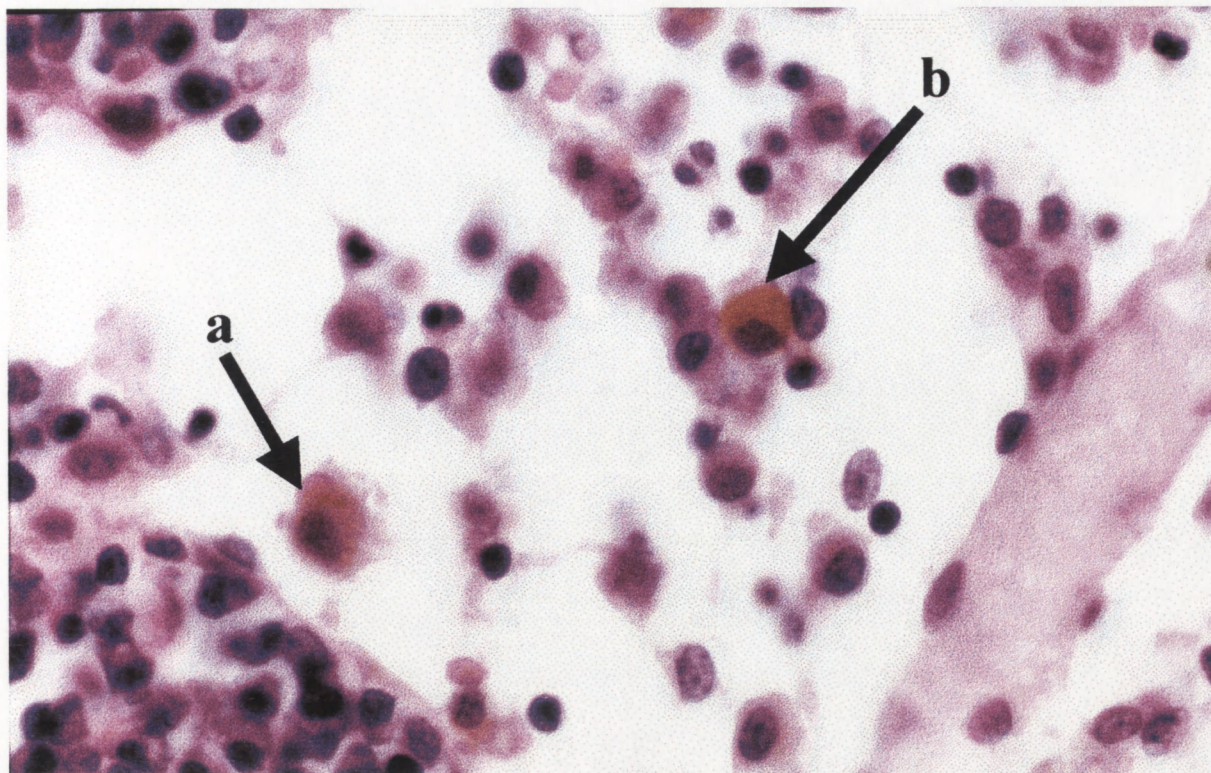
Ryc.IV.1 Obraz limfoscyntygrafii kończyn dolnych u chorego z obrzękiem pourazowym lewej kończyny dolnej. Widoczne poszerzenie cienia naczyń chłonnych i powiększenie obrazów pachwinowych węzłów chłonnych kończyny objętej obrzękiem.



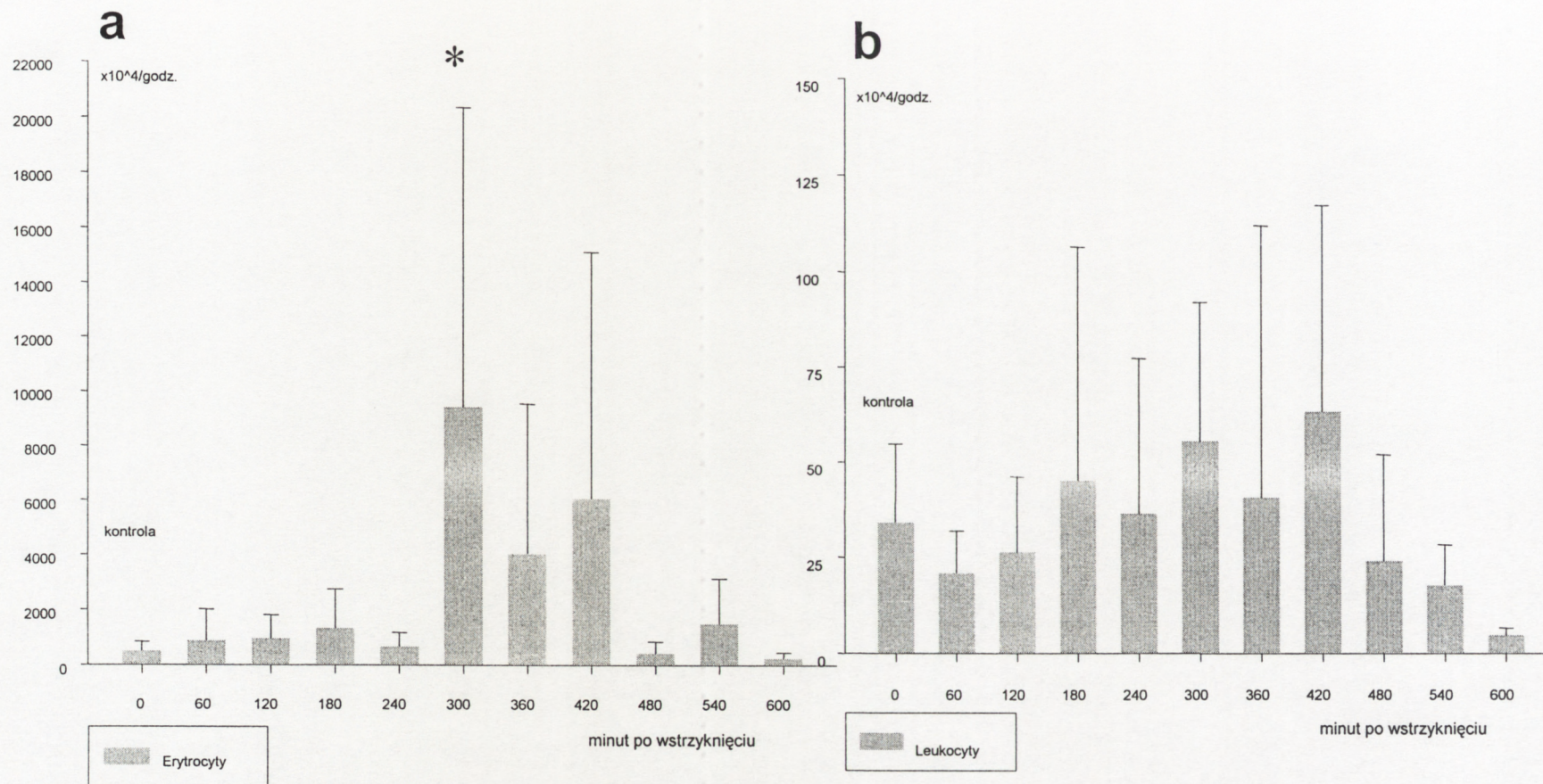
Ryc.IV.2 Obraz limfografii bezpośredniej 7 dni po bezpośrednim wstrzyknięciu autologicznej krwi żylniej do naczynia chłonnego. Poniżej powiększenie wybranego fragmentu. Widoczna pętla druciana założona luźno dokoła naczynia chłonnego. Przepływ w naczyniu zachowany.



Ryc.IV.3 Obraz limfografii bezpośredniej 7 dni po bezpośrednim wstrzyknięciu autologicznej krwi żyłnej do naczynia chłonnego. Poniżej powiększenie wybranego fragmentu. Widoczna pętla druciana założona luźno dookoła naczynia chłonnego. Przepływ w naczyniu zachowany.

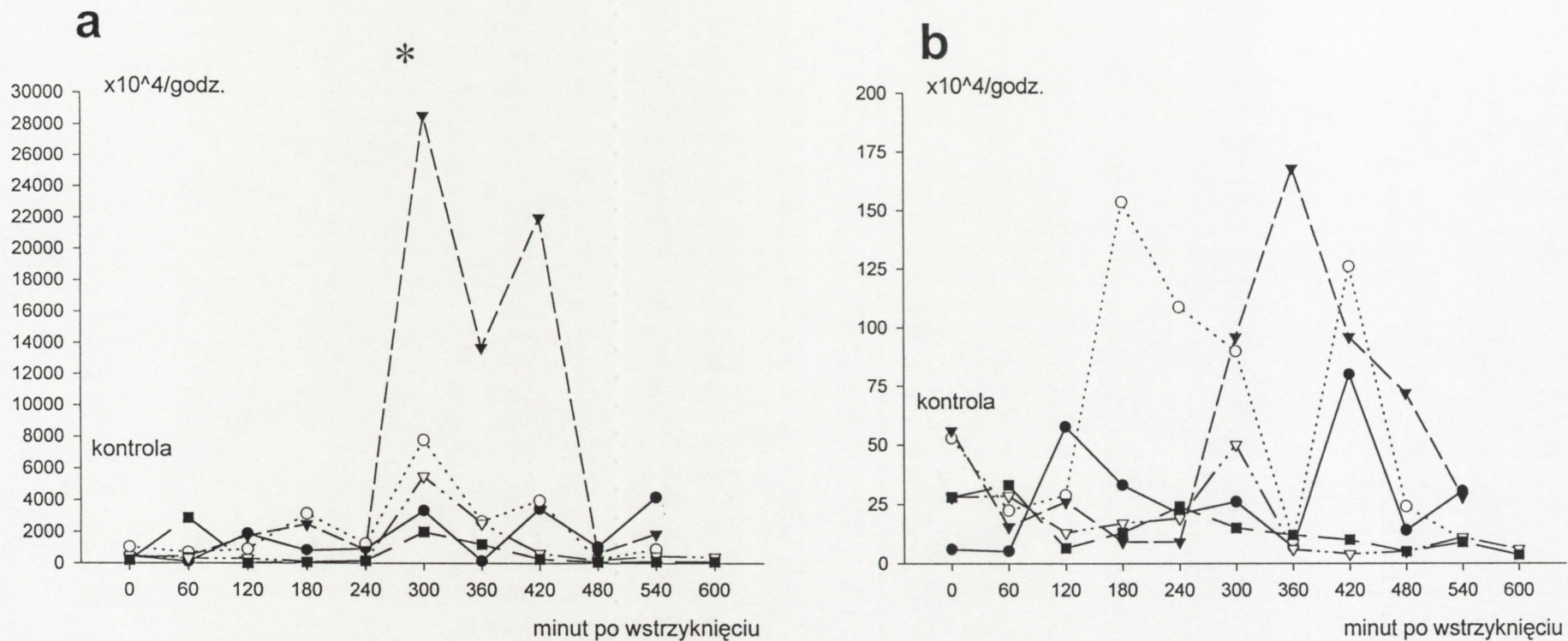


Ryc.IV.4 i 5 Złogi hemosyderyny (a) oraz elementy subkomórkowe (b) i całe erytrocyty (c) w cytoplazmie makrofagów węzłów chłonnych widoczne w 7 dni po wstrzyknięciu autologicznej krwi żylniej bezpośrednio do naczynia chłonnego. Barwienie HE, pow. 1000x.

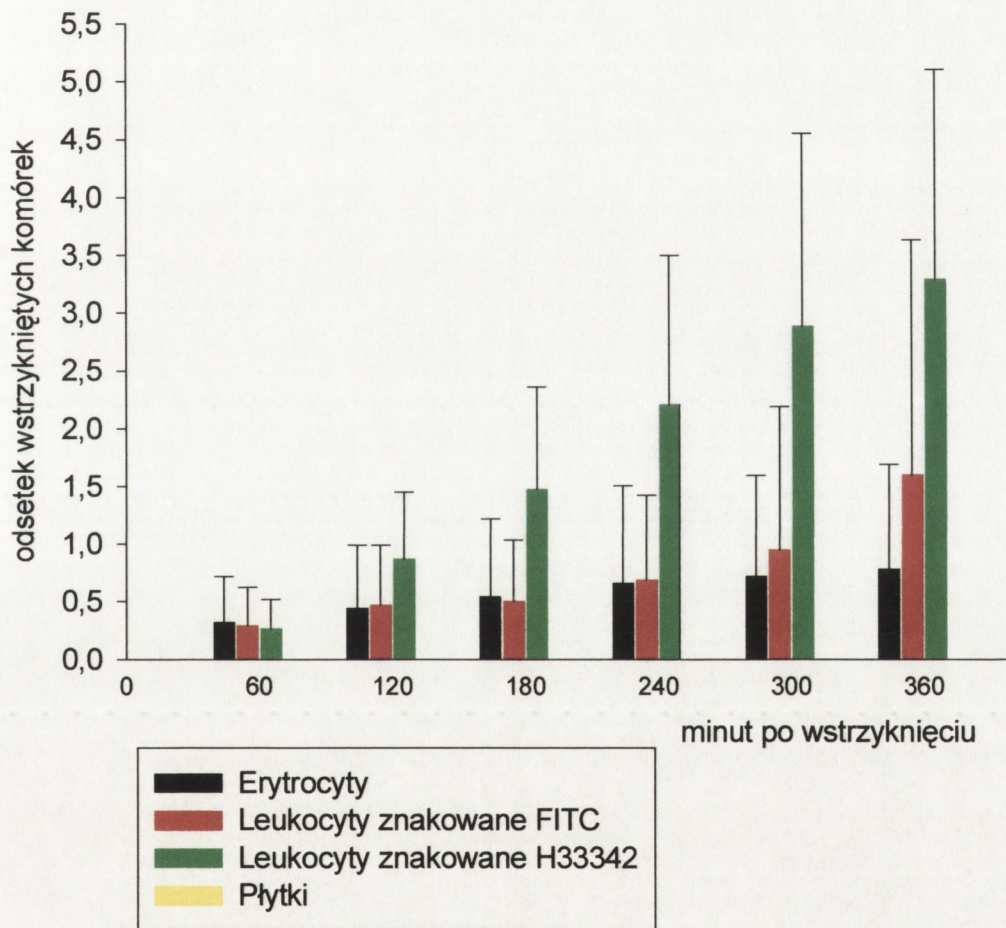


Ryc. IV.6 Liczba erytrocytów (a) i leukocytów (b) w kolejnych próbkach chłonki przedwężłowej zbieranych co godzinę po podskórnym podaniu 1.5 ml autologicznej, świeżej krwi żyłnej bez dodatku antykoagulantów. Wyniki średnie \pm SD, $n=5$.

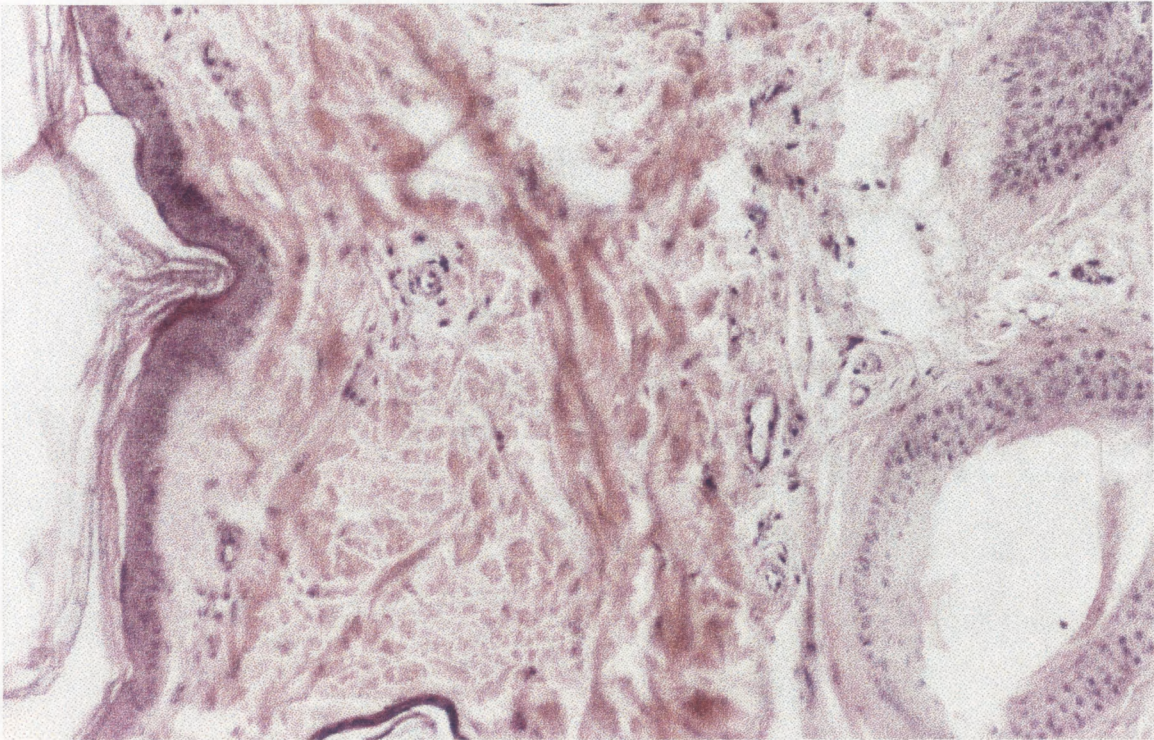
(*) statystycznie znamienne różnice w porównaniu z wartościami wyjściowymi (kontrola), ($p < 0.05$, test Dunnetta).



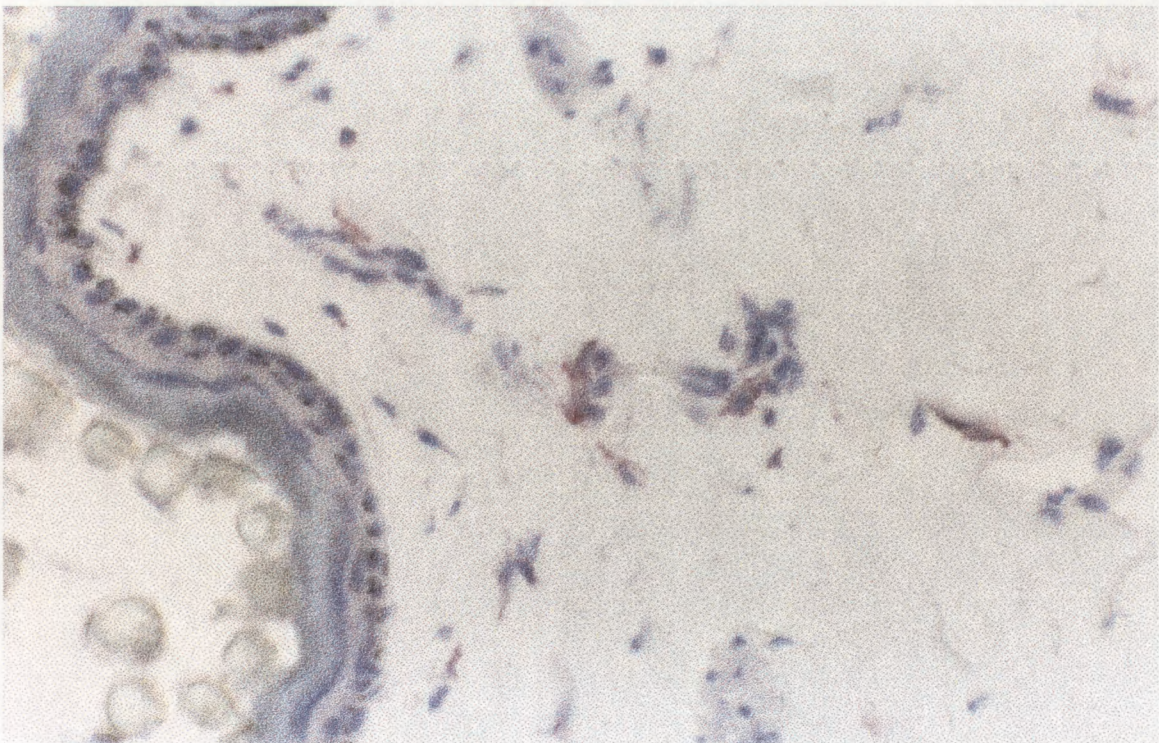
Ryc. IV.7 Liczba erytrocytów (a) i leukocytów (b) w kolejnych próbkach chłonki przedwężłowej zbieranych co godzinę po podskórnym podaniu 1.5 ml autologicznej, świeżej krwi żyłnej bez dodatku antykoagulantów. Wyniki z poszczególnych doświadczeń. N=5. (*) statystycznie znamienne różnice z kontrolą ($P < 0.05$, test Dunnetta).



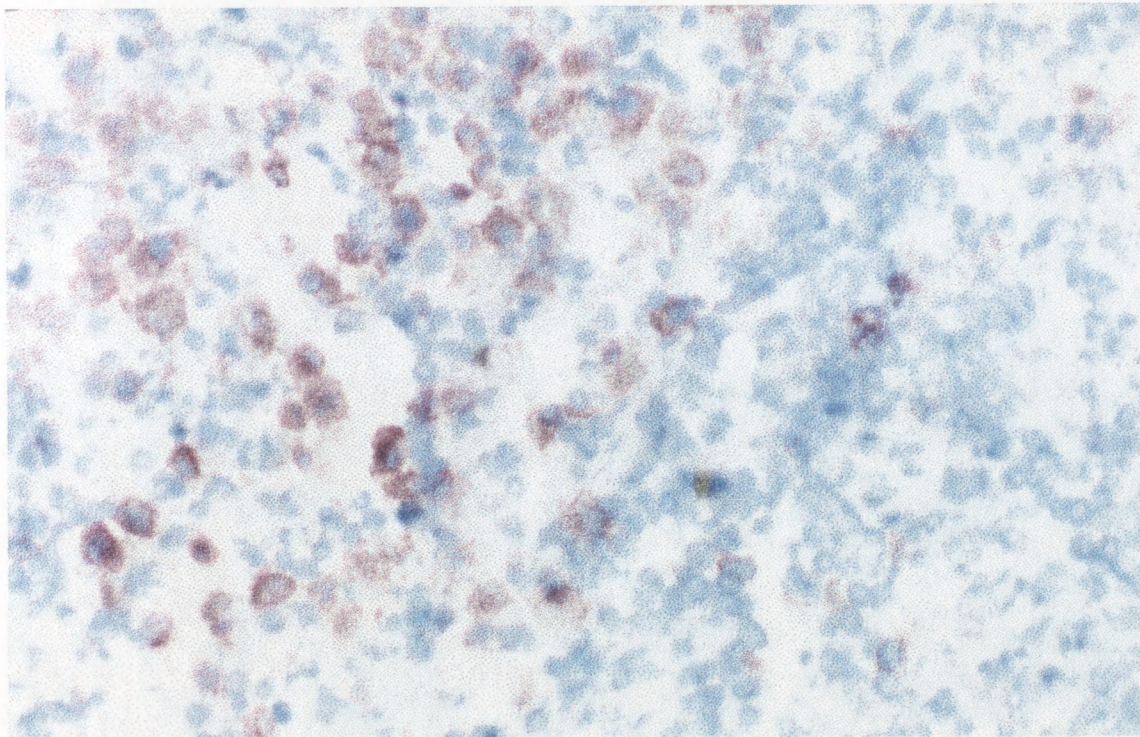
Ryc.IV.8 Odsetek odprowadzanych układem chłonnym z kończyny elementów morfotycznych autologicznej krwi żyłnej wstrzykniętej podskórną w grzbiet tylnej łapy psa w czasie 6 godzinnej obserwacji. Wartości średnie \pm SD. Stwierdzono we wszystkich punktach czasowych statystycznie znaczne zwiększenie odsetka odprowadzanych układem chłonnym erytrocytów i znakowanych zarówno FITC jak i H₃₃₃₄₂ leukocytów w porównaniu z wartościami wyjściowymi ($p < 0.05$, test Dunnetta). Obecności w chłonce przedwężłowej wstrzykniętych podskórną płytek krwi nie stwierdzono.



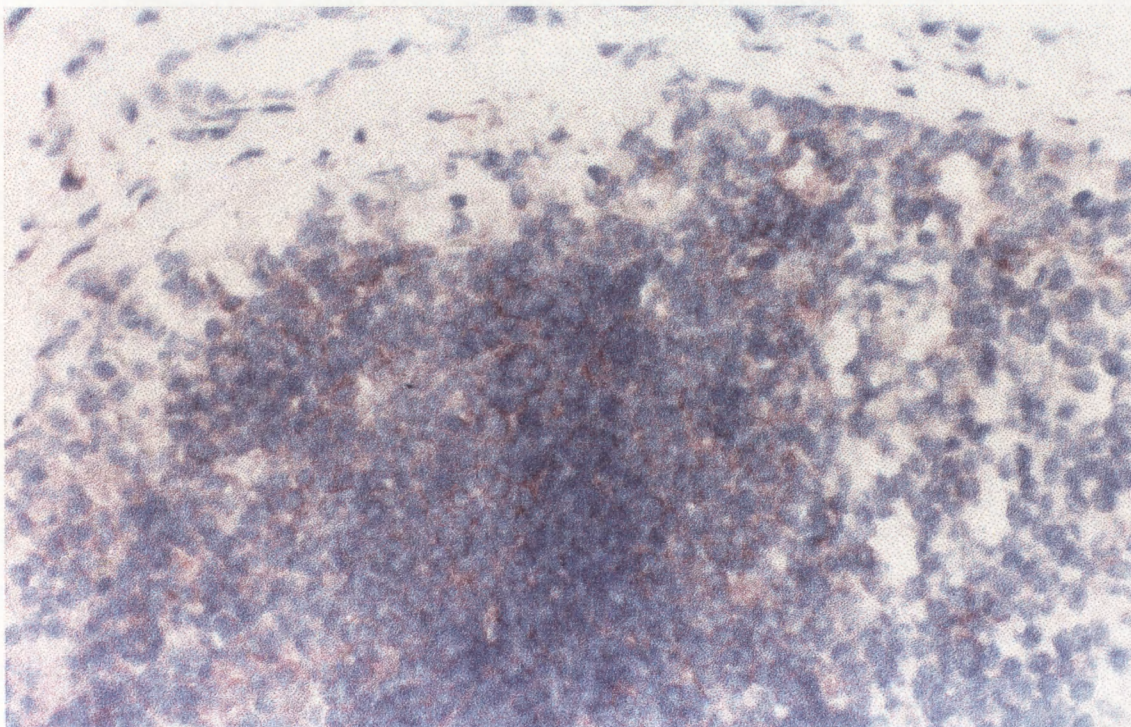
Ryc.IV.9 Preparat histologiczny wykonany ze skóry i tkanki podskórnej z miejsc wstrzyknięcia 7 dni po trzykrotnym podaniu po 1 ml autologicznej krwi żyłnej. Barwienie HE. Nie zaobserwowano zmian w skórze i tkance podskórnej. Powiększenie x200



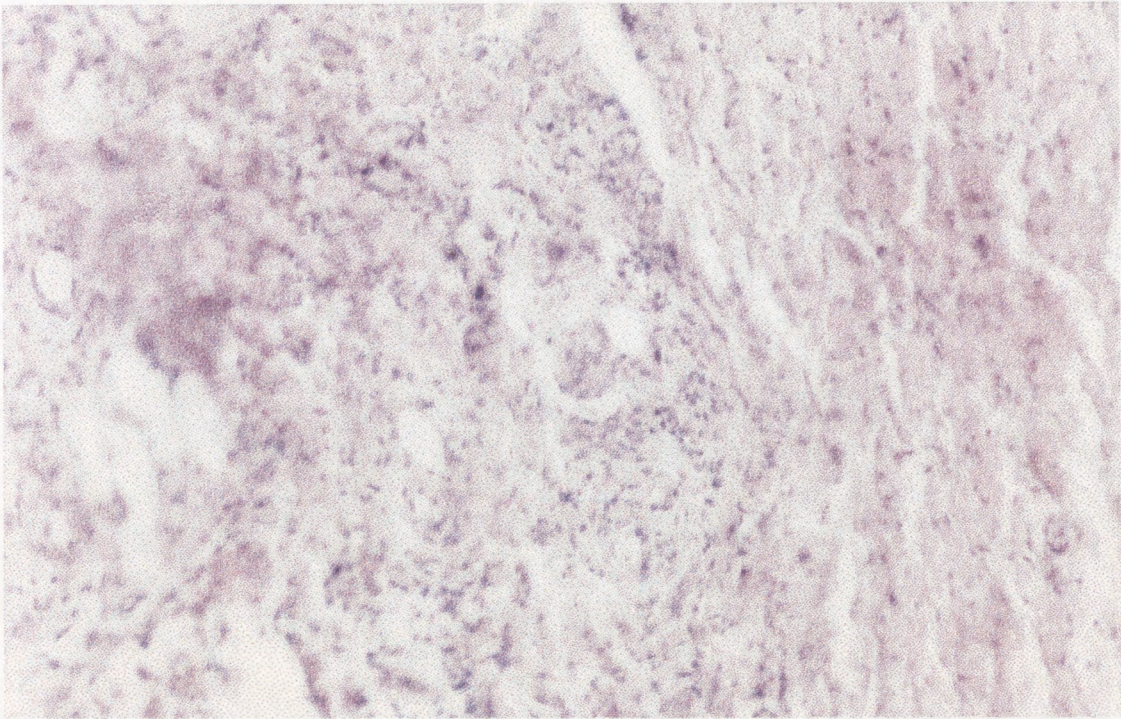
Ryc.IV.10 Preparat immunohistochemiczny wykonany ze skóry i tkanki podskórnej z miejsc wstrzyknięcia 7 dni po trzykrotnym podaniu po 1 ml autologicznej krwi żyłnej. Barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciw Mac3. Nie zaobserwowano zmian w skórze i tkance podskórnej. Powiększenie x200.



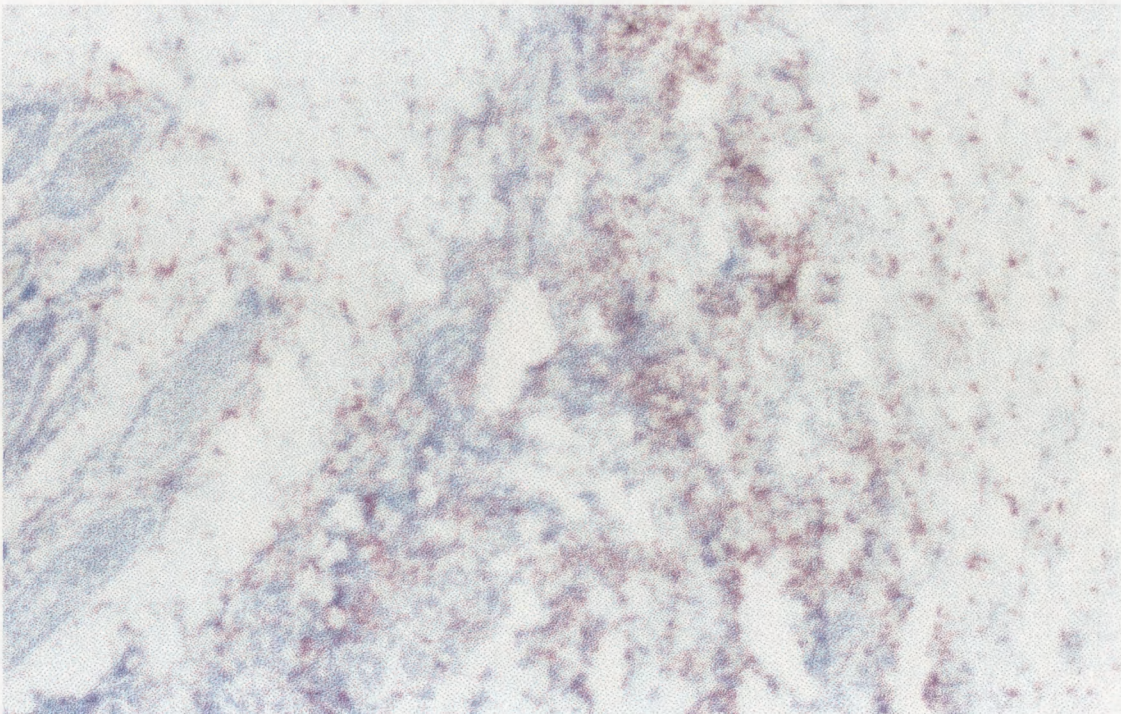
Ryc.IV.11 Preparat immunohistochemiczny podkolanowego węzła chłonnego wykonany 7 dni po trzykrotnym podskórnym wstrzyknięciu w okolicę grzbietu tylnej łapy po 1 ml autologicznej krwi żylniej. Barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciw Mac3. Nieliczne komórki Mac3+ (makrofagi) w zatoce w części przykorowej. Powiększenie x200.



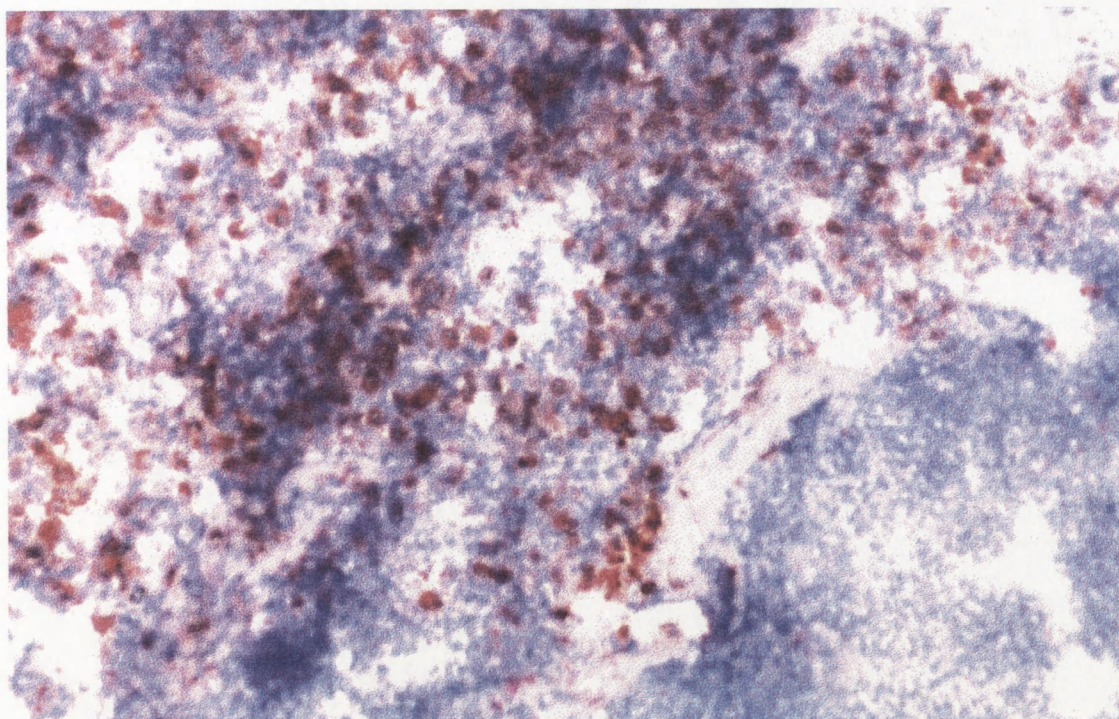
Ryc.IV.12 Preparat immunohistochemiczny podkolanowego węzła chłonnego wykonany 7 dni po trzykrotnym podskórnym wstrzyknięciu w okolicę grzbietu tylnej łapy po 1 ml autologicznej krwi żylniej. Barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciw DR. Pojedyncze komórki Mac3+. Powiększenie x200.



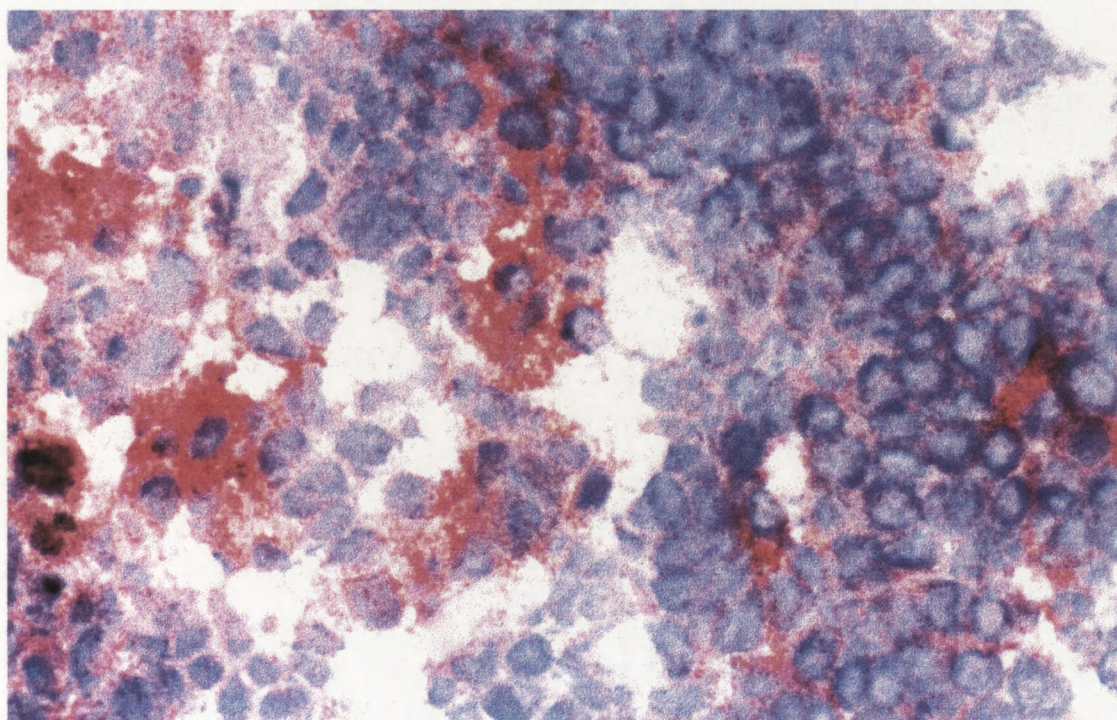
Ryc.IV.13 Preparat histologiczny wykonany ze skóry i tkanki podskórnej z miejsc wstrzyknięcia 7 dni po trzykrotnym podaniu po 10^7 komórek autologicznego szpiku kostnego. Widoczne nacieki komórek zapalnych: komórek plazmatycznych, makrofagów i granulocytów (głównie obojętnochłonnych, mniej kwasochłonnych). Barwienie HE. Powiększenie x200



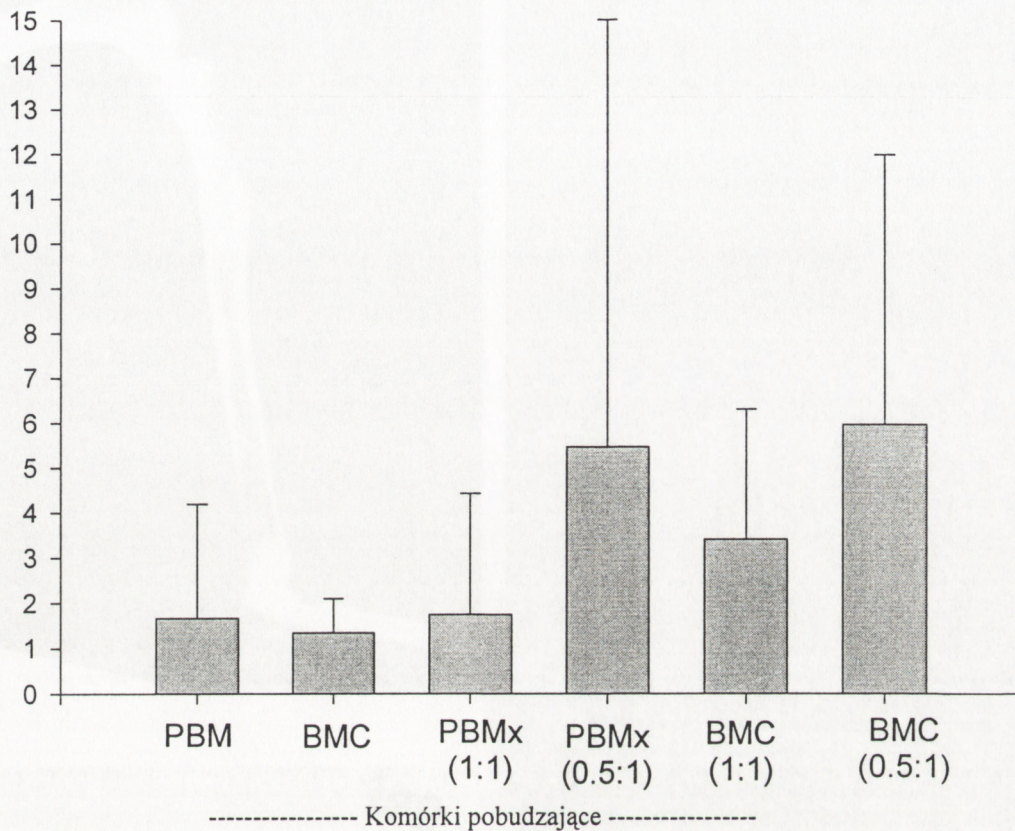
Ryc.IV.14 Preparat immunohistochemiczny wykonany ze skóry i tkanki podskórnej z miejsc wstrzyknięcia 7 dni po trzykrotnym podaniu po 10^7 komórek autologicznego szpiku kostnego. Barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciw Mac3. Liczne występujące pojedynczo i w skupiskach komórki Mac3+. Powiększenie x200.



Ryc.IV.15 Preparat immunohistochemiczny podkolanowego węzła chłonnego wykonany 7 dni po trzykrotnym podskórnym podaniu w okolicę grzbietu tylnej łapy po 10^7 komórek autologicznego szpiku kostnego. Barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciw Mac3. Widoczne liczne komórki Mac3+; między nimi duże komórki, prawdopodobnie szpikowe. Powiększenie x200.



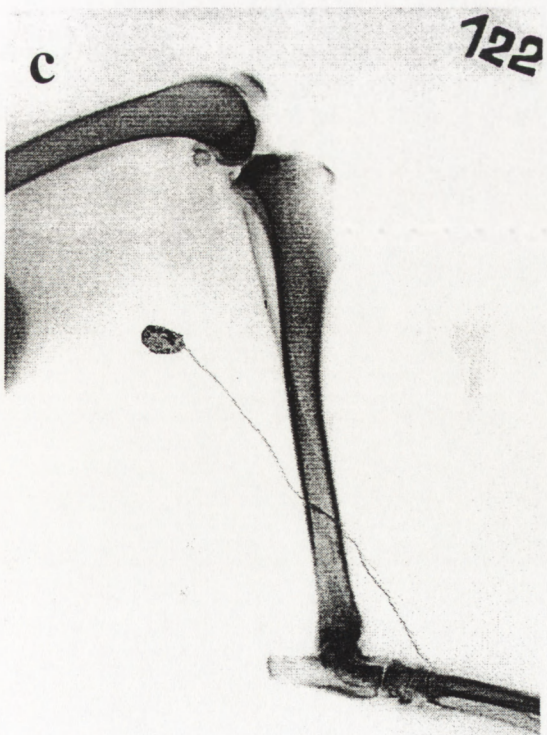
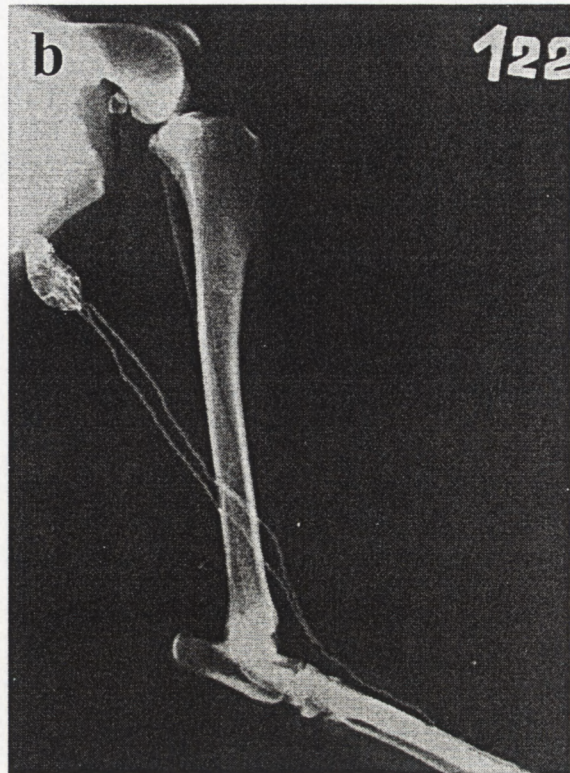
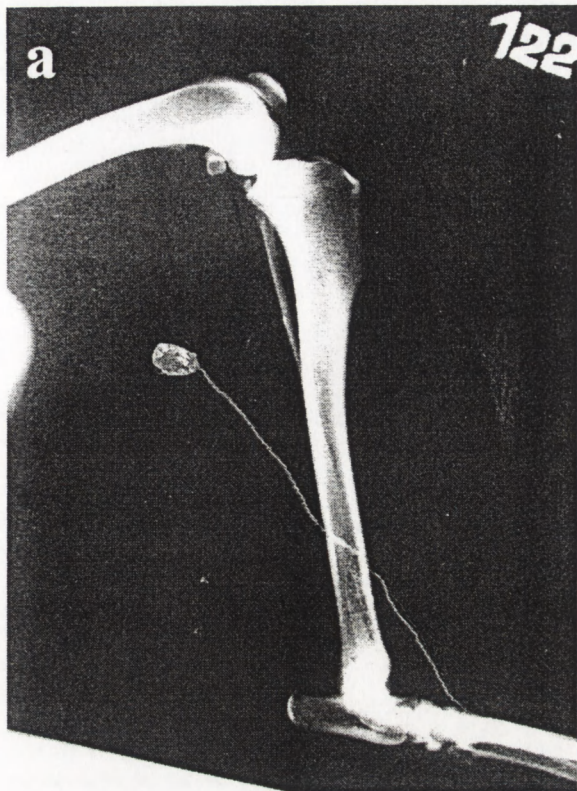
Ryc.IV.16 Preparat immunohistochemiczny podkolanowego węzła chłonnego wykonany 7 dni po trzykrotnym podskórnym podaniu w okolicę grzbietu tylnej łapy po 10^7 komórek autologicznego szpiku kostnego. Barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciw DR. Widoczne liczne komórki DR+; między nimi duże komórki prawdopodobnie szpikowe. Powiększenie x400.



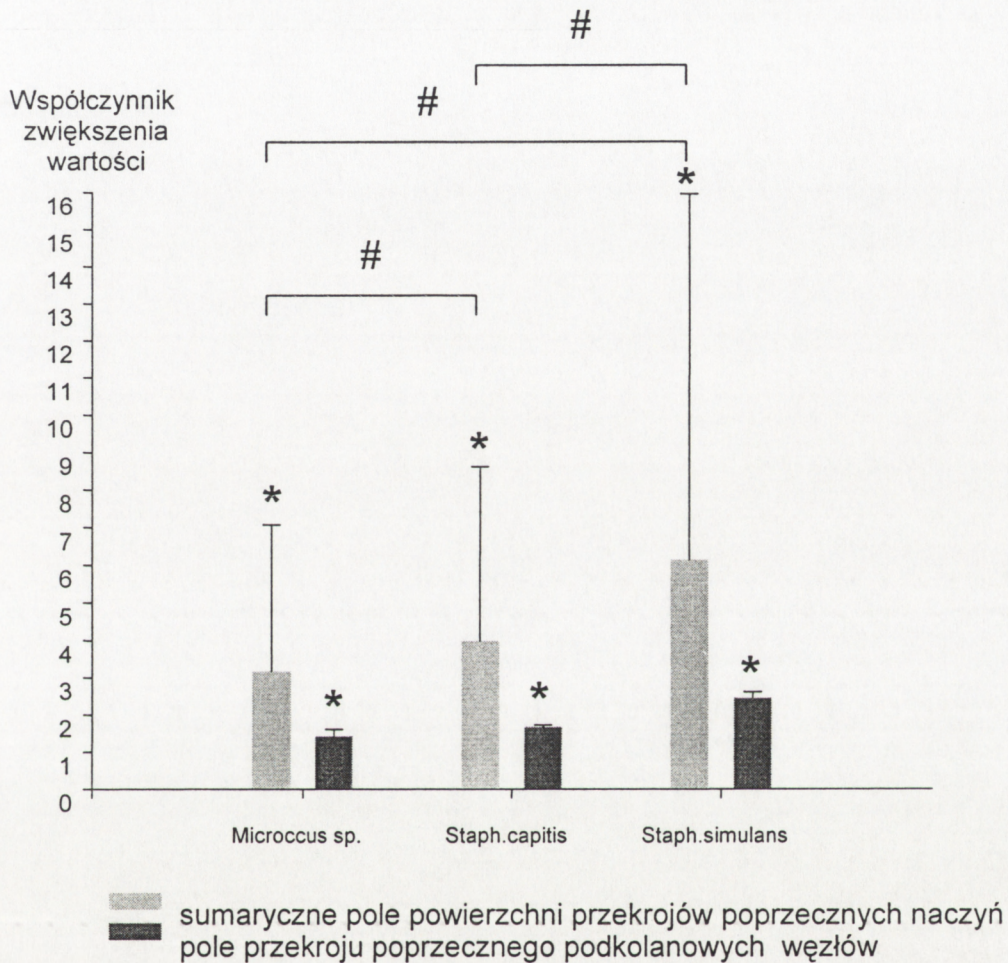
Ryc.IV.17 Wpływ in vitro mononuklearów krwi obwodowej (PBM) i komórek szpiku kostnego (BMC) na aktywację komórek węzła chłonnego (LN). Indeksy stymulacji (wartość / autotransformacja) hodowli mieszanych. Hodowle sześciodniowe. PBMx i BMCx - komórki blokowane mitomycyną C w proporcjach stymulatorów do efektorów 1:1 i 0.5:1. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD.

(*) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice w stosunku do wyników autotransformacji (test t-Studenta).

Ryc.IV.18 Obrazy limfocytów komórek podskórnych wstrzykniętych do żył w celu badania komórkowego przewodzenia limfy w układzie naczyniowym i w celu badania związku między przewodzeniem limfy a pulsatywnym wstrzyknięciem.



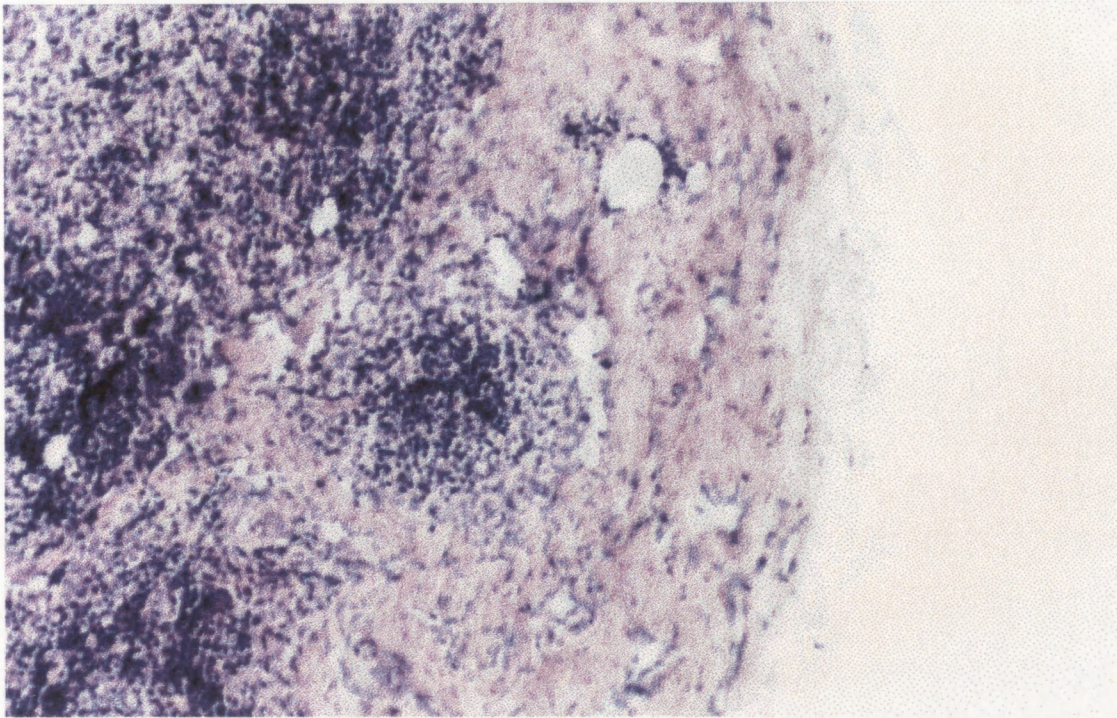
Ryc.IV.18 Obrazy limfografii bezpośrednich tylnych łap psa wyjściowej (a) i po serii 43 podskórnych wstrzyknień (b) żywych komórek bakteryjnych *Staphylococcus simulans*. Komputerowe przetworzenie limfogramów pozwoliło na wyraźniejsze zobrazowanie uwidocznionych naczyń i węzłów (c i d). W tym przypadku stwierdzono poszerzenie i zwiększenie liczby przedwęzłowych naczyń chłonnych oraz znaczne powiększenie podkolanowego węzła chłonnego.



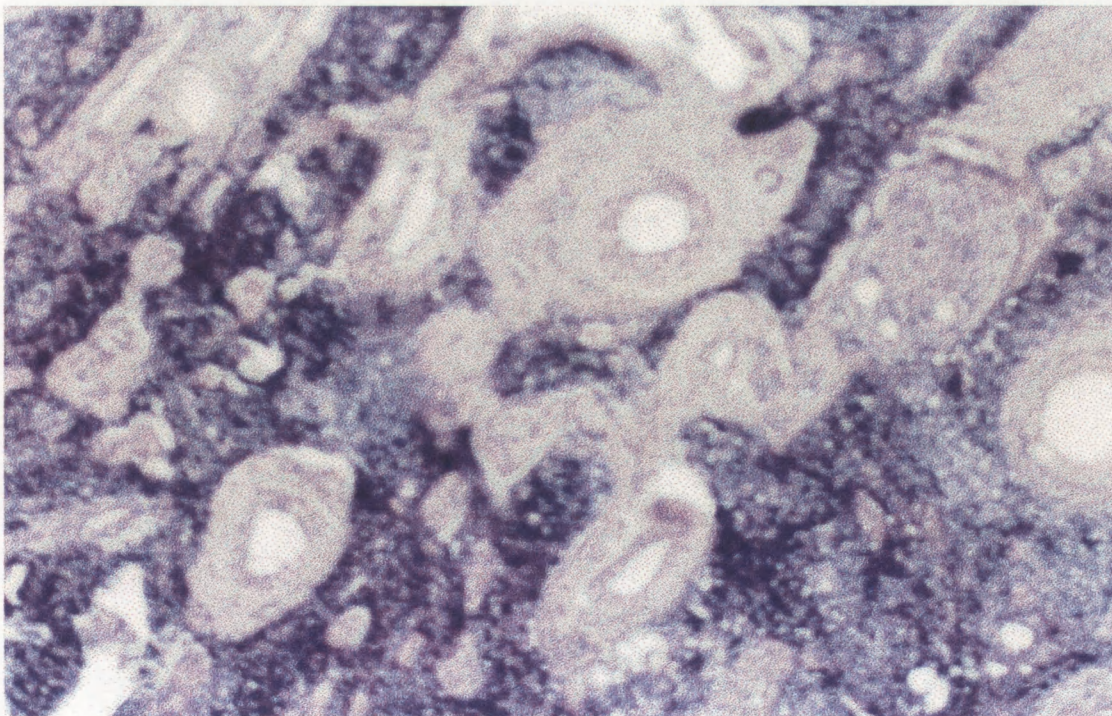
Ryc.IV.19 Wpływ przewlekłego zakażenia bakteryjnego szczepami obecnymi na skórze psa na elementy strukturalne układu chłonnego kończyny. Porównanie sumarycznych pól powierzchni przedwęzłowych naczyń chłonnych i podkolanowych węzłów chłonnych przed i po serii 43-krotnych wstrzyknięć zawiesin żywych bakterii. Wartości średnie \pm SD.

(*) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice po serii wstrzyknięć w porównaniu z wartościami wyjściowymi (test t-Studenta).

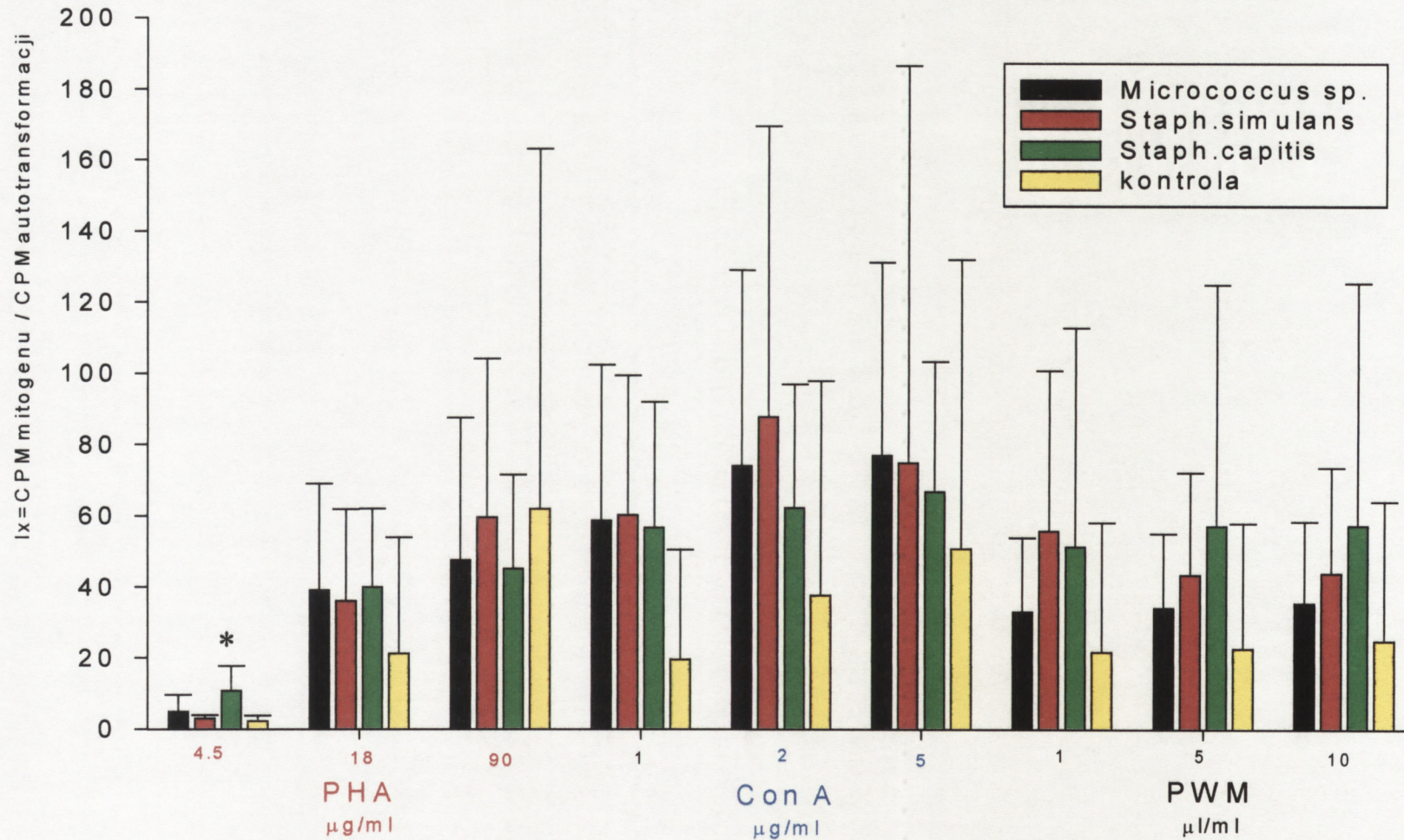
(#) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami bakteryjnymi (test t-Studenta).



Ryc.IV.20 Preparat histologiczny podkolanowego węzła chłonnego wykonany po serii 43-krotnego podskórnego wstrzyknięcia w okolicę grzbietu tylnej łapy po 10^7 komórek żywych bakterii szczepu *Staphylococcus simulans*. Widoczne pogrubienie torebki węzła i deplecja grudek chłonnych. Barwienie HE. Powiększenie x200.

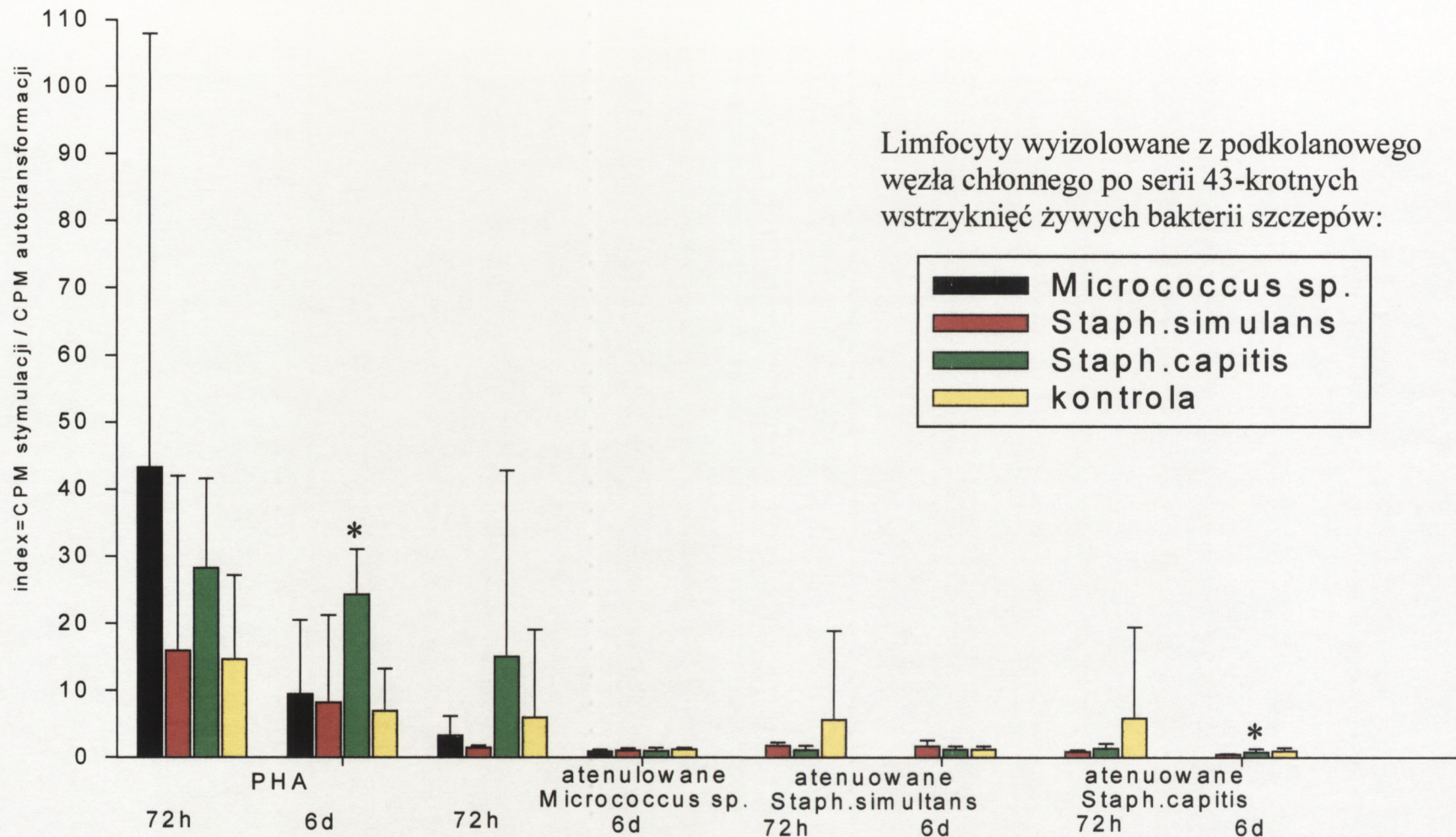


Ryc.IV.21 Preparat histologiczny podkolanowego węzła chłonnego wykonany po serii 43-krotnego podskórnego wstrzyknięcia w okolicę grzbietu tylnej łapy po 10^7 komórek żywych bakterii szczepu *Staphylococcus capitis*. Widoczne wolne przestrzenie otoczone wałem tkanki łącznej prawdopodobnie po opróżnionych ropniach. Barwienie HE. Powiększenie x200.



Ryc.IV.22 Indeksy stymulacji (CPM mitogenu / CPM autotransformacji) mitogenami (PHA, Con A i PWM) limfocytów podkolanowych węzłów chłonnych (LN) po 43-krotnym podskórnym wstrzyknięciu zawiesin żywych komórek bakteryjnych w grzbiet tylnych łap. Hodowle 72-godzinne. Wyniki średnie \pm SD, n=4.

(*) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej (test t-Studenta).



Ryc.IV.23 Indeksy stymulacji limfocytów podkolanowych węzłów chłonnych po 43-krotnym podskórnym wstrzyknięciu zawiesin żywych komórek bakteryjnych okolicę grzbietów tylnych łap stymulowanych w hodowli zawiesinami tych samych atenuowanych komórek bakteryjnych. Hodowle 72-godzinne i 6-dniowe. Wartości średnie \pm SD, n=4. (*) statystycznie znamienne ($p < 0.05$) różnice w porównaniu z kontrolą (test t-Studenta)