

УДК 612.017.1:616.71–001.5–007.235–089.227.84

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ЗАМЕДЛЕННОЙ КОНСОЛИДАЦИЕЙ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ЗАКРЫТОЙ ТРАВМЫ ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

Чепелева М.В., Карасев А.Г., Самусенко Д.В.,
Кузнецова Е.И.

ФГБУ «Российский научный центр» «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России», Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Изучены особенности иммунного статуса 19 пациентов с замедленной консолидацией костной ткани через 7–18 месяцев после закрытой травмы голени. Типирование лимфоцитов периферической крови осуществлялось методом лазерной проточной цитометрии. Определение концентрации иммуноглобулинов и цитокинов осуществлялось методом иммуноферментного анализа. При нормальной репаративной активности костной ткани исследуемые показатели иммунитета, находились в пределах границ физиологической нормы. Замедленная консолидация костной ткани характеризовалась умеренной активацией клеточного иммунитета на фоне умеренного повышения *TNFα*.

Ключевые слова: переломы, нарушение консолидации, иммунитет

IMMUNE STATUS FEATURES IN PATIENTS WITH DELAYED BONE TISSUE CONSOLIDATION AFTER CLOSED INJURY OF LONG TUBULAR BONES

Chepeleva M.V., Karasev A.G., Samusenko D.V.,
Kuznetsova E.I.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center» «Restorative Traumatology and Orthopaedics» (RISC RTO) of
the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

The immune status features in 19 patients with delayed bone tissue consolidation 7-18 months after closed injury of the leg studied. The typing of peripheral blood lymphocytes performed by the technique of laser flow cytometry. The concentration of immunoglobulins and cytokines determined by the method of immunofluorescence analysis. The studied immunity parameters were within the limits of physiological standard boundaries for normal reparative activity of bone tissue. The delayed consolidation of bone tissue characterized by moderate activation of cellular immunity through *TNFα* moderate increase.

Keywords: fractures, consolidation disorder, immunity

Переломы длинных трубчатых костей сопровождаются общими и местными изменениями. Посредством нейрогуморальных механизмов в организме включаются адаптационные и компенсаторные системы, направленные на выравнивание гомеостаза и восстановление поврежденной костной ткани. Оптимальные условия для репаративной регенерации создаются в условиях неподвижности костных отломков. При несоблюдении этих условий возникающий диастаз заполняется волокнистой соединительной тканью, постепенно превращающейся в фиброзную ткань, а при выраженной подвижности отломков образуется также хрящевая ткань и формируется ложный сустав [3].

Иммунная система оказывает несомненное влияние на характер репаративных процессов в поврежденной зоне [1]. Важными факторами регуляции остеогенеза являются лимфоциты, моноциты-макрофаги, нейтрофилы [2]. В метаболизме костной ткани активное участие принимают остеокласты с локальной продукцией цитокинов [7].

Цель исследования – изучить особенности иммунного статуса пациентов с замедленной консолидацией костной ткани через 7 – 18 месяцев после закрытой травмы длинных трубчатых костей.

Материалы и методы исследования

Обследовано 39 пациентов через 7 – 18 месяцев после закрытых переломов длинных трубчатых костей, которые были разделены на две группы: основную и контрольную. Основная группа включала 19 пациентов в возрасте $41,8 \pm 3,4$ лет, поступивших на лечение с последствиями закрытых переломов верхних и нижних конечностей (бедро – 9, голени – 8, плеча – 2): 10 мужчин и 9 женщин. Из них 8 пациентов до поступления лечились с использованием внутренней фиксации (накостный остеосинтез – 5 больных, интрамедуллярный блокируемый стержень – 3 больных), а 11 – с применением внешнего остеосинтеза. Причины нарушений консолидации были следующими: при внешней фиксации – неправильно выбранная схема остеосинтеза, отсутствие точной репозиции и раннее снятие аппарата. При использовании накостного остеосинтеза в двух случаях отмечали неправильный выбор типа или размера металлофиксатора, что не создавало прочной фиксации, в трех – перелом пластины или винтов. С блокируемым ин-

трамедуллярным стержнем поступило на лечение трое больных с тяжелыми оскольчатыми переломами, в результате чего даже в условиях стабильной фиксации осколки не были адаптированы к своему ложу, вследствие чего формировался краевой дефект и сохранялся диастаз между основными фрагментами. В контрольной группе использованы иммунологические показатели 20 пациентов аналогичного возраста с закрытыми переломами верхних и нижних конечностей, пролеченных в РНЦ ВТО по разработанным методикам с соблюдением всех методических принципов чрескостного остеосинтеза, у которых в обычные сроки было достигнуто сращение костных отломков в правильном положении. В исследование не включались пациенты с сопутствующей соматической патологией, способной повлиять на результаты иммунологического исследования.

Типирование лимфоцитов периферической крови осуществлялось методом лазерной проточной цитометрии на цитометре «BECKMAN COULTER EPICS XL» (США) с помощью двух, трёх, четырехцветных моноклональных антител компании «Immunotech» (Франция). Количественное определение иммуноглобулинов классов и цитокинов осуществлялось методом ИФА на иммуноферментном анализаторе BIO-ТЕК Instruments Inc, ELx808 (США) с использованием набора реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Определение циркулирующих иммунных ком-

плексов (ЦИК) проводилось методом преципитации 3,5% ПЭГ (ММ 6000). На проведение клинических исследований получено разрешение комитета по этике ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава».

Анализ результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения AtteStat, выполненного как надстройка к «Microsoft Excel» программного продукта «Microsoft Office». Полученные данные обрабатывались с помощью методов непараметрической статистики с использованием U – критериев Вилкоксона, Манна – Уитни. Результаты исследования представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25 и 75 процентиля). Для оценки корреляции применялся ранговый критерий Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

В отдаленные сроки после закрытой травмы длинных трубчатых костей показатели лейкограммы (лейкоциты, лимфоциты), независимо от результата хирургического лечения, находились в пределах значений физиологической нормы и не имели статистически значимых отличий (табл. 1).

Таблица 1

Показатели лейкограммы у пациентов со сросшимися переломами и несовершенным остеогенезом в сроки от 1,5 до 2 лет после травмы

Показатель	Замедлена консолидация костной ткани	Сращение перелома в сроки
Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	6,7 (5,9 – 8,3)	6,1 (4,9 – 7,3)
Лимфоциты (%)	35,0 (26,5 – 38,0)	31,0 (26,0 – 37,3)
Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	2,2 (1,9 – 2,5)	1,83 (1,53 – 2,12)
Моноциты (%)	9,0 (8,0 – 10,0)	9,0 (7,8 – 10,0)
Моноциты ($10^9/\text{л}$)	0,64* (0,53 – 0,72)	0,52 (0,45 – 0,67)

Примечание. * – $p \leq 0.05$ в сравнении с показателями пациентов у которых сращение было достигнуто в срок.

При этом абсолютное количество моноцитов в группе с нарушенным остеогенезом было достоверно выше, чем в группе с отсутствием послеоперационных осложнений. Соотношение CD4 к CD8 было выше в группе с нарушенным остеогенезом в свя-

зи с повышением в этой группе количества Т-хелперов и снижением числа цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с показателями, зарегистрированными при нормальном течении репаративных процессов в костной ткани (табл. 2).

Таблица 2

Показатели клеточного иммунитета у пациентов со сросшимися переломами и несовершенным остеогенезом в сроки от 1,5 до 2 лет после травмы

Показатель	Замедленна консолидация костной ткани	Сращение перелома в сроки
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (%)	74,8 (70,5 – 81,0)	79,7 (73,6 – 81,8)
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (10 ⁹ /л)	1,7 (1,4 – 1,98)	1,5 (1,21 – 1,73)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	49,4* (44,6 – 54,0)	44,6 (41,7 – 50,8)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	1,1* (0,9 – 1,3)	0,8 (0,7 – 1,1)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	26,1* (22,0 – 28,5)	28,9 (27,1 – 36,5)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,6 (0,46 – 0,66)	0,53 (0,45 – 0,71)
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	11,3 (8,4 – 14,0)	10,3 (6,7 – 12,4)
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,27* (0,18 – 0,31)	0,16 (0,13 – 0,24)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	3,8 (3,1 – 6,6)	5,5 (4,7 – 8,4)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,07 (0,05 – 0,1)	0,11 (0,08 – 0,13)
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (%)	10,0 (8,1 – 13,2)	9,1 (7,1 – 11,4)
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,23* (0,18 – 0,33)	0,16 (0,14 – 0,23)
CD3 ⁺ HLA-DR (10 ⁹ /л)	4,7* (3,5 – 7,0)	3,7 (2,7 – 4,1)
CD3 ⁺ HLA-DR (%)	0,11* (0,07 – 0,15)	0,07 (0,04 – 0,08)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (%)	3,5 (3,15 – 4,9)	2,9 (2,7 – 3,8)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,08* (0,06 – 0,12)	0,06 (0,05 – 0,08)
CD14 ⁺ HLA-DR (%)	84,0* (81,6 – 86,8)	88,2 (85,9 – 90,3)

Примечание. * – $p \leq 0.05$ в сравнении с показателями пациентов у которых сращение было достигнуто в срок

Несмотря на статистически значимые отличия, данные показатели в обеих группах не выходили за пределы нормативных границ, субпопуляционные нарушения отсутствовали. Абсолютное содержание натуральных киллеров в группе с нарушенным остеогенезом было достоверно выше, чем при нормальном течении посттравматиче-

ского периода. Более высокими были абсолютные значения В-лимфоцитов, значения иммуноглобулинов классов А и G при этом в обеих группах достоверно не отличались, а содержание IgM при замедленной консолидации костной ткани было ниже, чем при нормальном течении посттравматического периода (табл. 3).

Таблица 3

Показатели гуморального иммунитета и цитокинового звена иммунной системы у пациентов со сросшимися переломами и несовершенным остеогенезом в сроки от 1,5 до 2 лет после травмы

Показатель	Замедленная консолидация костной ткани	Сращение перелома в сроки
IgA (мг/мл)	0,96 (0,74 – 1,75)	1,11 (0,81 – 1,37)
IgM (мг/мл)	0,95* (0,71 – 1,13)	1,49 (1,2 – 1,9)
IgG (мг/мл)	11,4 (8,7 – 14,4)	9,6 (6,2 – 17,5)
IgE (МЕ/ед)	67,8 (16,7 – 196,4)	61,5 (16,9 – 106,4)
ЦИК (о.е.)	40,5* (30,9 – 77,8)	33,0 (19,0 – 43,0)
IL-1 β (пг/мл)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IL-4 (пг/мл)	0 (0 – 1,68)	0,09 (0 – 0,36)
IL-6 (пг/мл)	1,78 (0,97 – 5,23)	1,23 (0,56 – 2,3)
IL-8 (пг/мл)	8,26 (2,03 – 13,6)	6,25 (4,13 – 9,5)
IL-10 (пг/мл)	1,43 (0 – 4,01)	0,29 (0 – 1,64)
TNF α (пг/мл)	1,64* (0,66 – 3,28)	0 (0 – 0)
IFN α (пг/мл)	0,51 (0 – 6,7)	0 (0 – 0)

Примечание. * – $p \leq 0.05$ в сравнении с показателями пациентов у которых сращение было достигнуто в срок.

Более высоким в группе с нарушенным остеогенезом было как относительное, так и абсолютное количество клеток, несущих маркеры поздней активации Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR), и уровень ЦИК. Экспрессия HLA-DR на моноцитах была достоверно выше в группе с благоприятным течением посттравматического периода. При исследовании уровня сывороточных цитокинов, статистически значимые межгрупповые отличия были выявлены только в отношении TNF α , уровень которого был ниже в группе с замедленной консолидацией костной ткани.

Для того чтобы выявить, какие из показателей наиболее тесно связаны с замедленной консолидацией костной ткани, был проведен расчет ранговой корреляции Спирмэна. Наиболее высокий коэффициент Спирмэна (0,5 и выше) был выявлен у TNF α (коэффициент Спирмэна 0,61; значимость корреляции – 0,0001).

Обсуждение результатов. В группе больных с замедленной консолидацией

костной ткани через 7 – 18 месяцев после закрытой травмы длинных трубчатых костей мы наблюдали более высокие значения Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), клеток, несущих маркеры ранней и поздней активации лимфоцитов, чем у больных с нормальной регенераторной активностью костной ткани, что в целом свидетельствовало об умеренной активации клеточного звена иммунной системы.

Интересными были результаты по изучению особенностей гуморального иммунитета. У пациентов с замедленной консолидацией костной ткани мы наблюдали более высокие абсолютные значения В-лимфоцитов, которые, по мнению ряда авторов, принимают участие в процессах регенерации костной ткани [6, 8]. При этом уровень IgM был ниже, а концентрации сывороточных IgA и IgG были приблизительно такими же, как у больных с нормальным течением посттравматического периода. По мнению О.В. Бердюгиной, CD19 и IgM

являются факторами, отражающими регенерацию костной ткани [1]. Возможно, что, увеличение числа В – лимфоцитов (продукентов антител) у пациентов с замедленной консолидацией костной ткани, является адаптивной реакцией иммунной системы, направленной на повышение выработки иммуноглобулинов.

В литературных источниках имеются указания на то, что количество моноцитов также относится к факторам, отражающим регенерацию костной ткани [3]. У пациентов с нарушениями остеогенеза нами было выявлено достоверное повышение абсолютного количества моноцитов, при этом экспрессии HLA-DR на моноцитах была достоверно ниже, чем в контрольной группе. Известно, что экспрессия HLA-DR на моноцитах – надежный маркер дисфункции моноцитов, связанной с увеличением риска инфекционных осложнений при таких патологических состояниях как травма, серьезные ожоги, острый панкреатит, обширные хирургические вмешательства [4].

Полученные нами данные свидетельствует о некотором снижении способности моноцитов выполнять свою антигенпредставляющую функцию в группе с замедленной консолидацией костной ткани. Но, учитывая, что снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах не критическое, мы считаем, что данный показатель не является диагностически значимым при нарушениях остеогенеза.

В настоящее время не вызывает сомнений сам факт участия цитокинов, как медиаторов межклеточных взаимодействий, в процессах регенерации костной ткани. В частности, TNF α способствуют созреванию, дифференцировке и активации остеокластов. Механизм резорбции костной ткани под действием TNF α обусловлен как способностью вызывать катаболизм костной ткани, так и препятствовать её восстановлению [5]. Возможно, этим объясняется повышение уровня сывороточного TNF α у больных с замедленной консолидацией костной ткани.

Наблюдаемые нами иммунологические нарушения у больных с нарушениями консолидации являются, на наш взгляд, вторичными и обусловлены сохраняющейся подвижностью костных отломков, нестабильностью металлоконструкций и отсутствием полноценного контакта костных отломков, металлозом, пролонгированным некрозом интерпонированных тканей.

Заключение

Таким образом, при нормальной репаративной активности костной ткани через 7 – 18 месяцев после травмы основные показатели клеточного иммунитета, гуморального иммунитета, цитокинового звена иммунной системы находятся в пределах границ физиологической нормы. Замедленная консолидация костной ткани, обусловленная отсутствием стабильной фиксации, характеризуется умеренной активацией клеточного иммунитета на фоне умеренного повышения TNF α .

Список литературы

1. Бердюгина О.В. Иммунологическое прогнозирование в травматологии и ортопедии. Екатеринбург: ИздатНаукаСервис, 2009. – 252 с.
2. Ерофеев С.А., Чепелева М.В., Гордиевских Н.И., Изотова С.П. Периферическая кровь, гемодинамика, остеогенез при удлинении голени по Илизарову (экспериментальное исследование) // Геней ортопедии. – 2004. – № 3. С. 60-64.
3. Ткаченко С.С. Остеосинтез. – Л.: Медицина, 1987. 272 с.
4. Chéron A., Monneret G., Landelle C. et al. Low monocytic HLA-DR expression and risk of secondary infection // Ann. Fr. Anesth. Reanim. – 2010. – Vol. 29, № 5. – P. 368-376.
5. Karieb S., Fox S.W. Suppression of T cell-induced osteoclast formation // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – Vol. 436, № 4. – P. 619-624.
6. Marusic A., Grcevic D., Katavic V. – Role of B lymphocytes in new bone formation // Lab. Invest. – 2000. – Vol. 80, № 11. – P. 1761-1774.
7. Maurer T., Zimmermann G., Maurer S. et al. Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1 // Mediators Inflamm. – 2012; 2012: 171209. doi: 10.1155/2012/171209. Epub 2012 Oct 24.
8. Pugliese L.S., Gonçalves T.O., Popi A.F. et al. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells // Immunobiology. – 2012. – Vol. 217, № 3. – P. 336-344.