

УДК 611.018.4:612.017.1-053.1:616.717/718-001.5-089.227.84

ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ЗАМЕДЛЕННЫМ СРАЩЕНИЕМ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ЗАКРЫТОЙ ТРАВМЫ ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

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

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

Изучены показатели врожденного иммунитета через 7 – 18 месяцев после закрытой травмы длинных трубчатых костей у пациентов с замедленной консолидацией костной ткани (n=19) и сращением перелома в оптимальные сроки (n=20). При нормальной репаративной активности костной ткани основные показатели врожденного иммунитета находились в пределах границ физиологической нормы. Замедленная консолидация костной ткани характеризовалась умеренным снижением способности моноцитов экспрессировать на своей поверхности HLADR, усилением кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидной активности нейтрофилов, способности нейтрофилов к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Ключевые слова: переломы, замедленное сращение, врождённый иммунитет

CONGENITAL IMMUNITY PARAMETERS IN PATIENTS WITH DELAYED BONE TISSUE UNION AFTER A CLOSED INJURY OF LONG TUBULAR BONES

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

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

The parameters of congenital immunity studied 7-18 months after a closed injury of long tubular bones in patients with delayed bone tissue consolidation (n=19) and fracture union achievement in optimal time periods (n=20). The main parameters of congenital immunity were within the boundaries of the physiological standard in case of bone tissue normal reparative activity. Delayed bone tissue consolidation was characterized by the moderate decrease of monocyte ability to express HLADR on their surface, as well as by enhancing the oxygen-dependent and oxygen-independent bactericidal activity of neutrophils, the neutrophil ability to form neutrophil extracellular traps.

Keywords: fractures, delayed union, congenital immunity

Одной из острых проблем здравоохранения является лечение осложнений переломов костей. Несмотря на современные достижения в травматологии и ортопедии доля неудовлетворительных результатов лечения переломов, обусловленных замедленной консолидацией и несовершенным остеогенезом костной ткани, остается довольно высокой от 5 до 40%. [4].

В экспериментах и клинических условиях доказано участие клеток иммунной системы, в частности нейтрофилов и моноцитов (макрофагов), в воспалительной и регенераторной фазах репаративного остеогенеза [3].

Однако, несмотря на проведенные исследования, значение факторов врожденного иммунитета остается не до конца изученным.

Цель исследования – изучить показатели врожденного иммунитета у 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 интрамедуллярным 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.

Для изучения фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН) применялась стандартная методика, основанная на количественном определении погложительной и переваривающей способности нейтрофилов по отношению к микробной тест – культуре (*Staphylococcus epidermidis* штамм № 9198 НИИЭМ). Рассчитывались следующие показатели ФАН: фагоцитарный показатель (ФП, %), фагоцитарное число (ФЧ, %). Кислородзависимую метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ – тест) по методу Park, в двух вариантах: спонтанном и стимулированном. Лизосомальную активность нейтрофилов определяли, используя цитохимическое исследование клеток. Активность миелопероксидазы (МП) определялась по Грехему – Кнолю. Уровень лизосомальных катионных белков (КБ) цитоплазмы устанавливали в реакции с бромфеноловым синим. Уровень МП и КБ выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Для подсчета нейтрофильных ловушек (НВЛ) использовали мазки крови, окрашенные по Романовскому – Гимза. Учет ФАН производился при помощи световой микроскопии под иммерсией, исходя из 100 подсчитанных нейтрофилов.

Определение содержания CD14+HLA-DR, характеризующих экспрессию HLA-DR на моноцитах, идентифицировали с помощью моноклональных антител компании «Immunotech» (Франция) методом лазерной проточной цитометрии на цитометре «BECKMAN COULTER EPICS XL» (США).

Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное добровольное согласие на меди-

цинское вмешательство и публикацию данных, полученных в результате исследования, без идентификации личности.

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 – критерия Вилкоксона, Манна – Уитни. Результаты исследования представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25 и 75 процентиля).

Результаты исследования и их обсуждение

По данным литературных источников, нейтрофилы наряду с другими клетками иммунной системы, не только обеспечивают иммунную реактивность организма, но и играют большую роль в обеспечении репаративных процессов. Нейтрофилы оказывают влияние на коллагеногенез и ремоделирование внеклеточного матрикса путем продукции факторов, активирующих фибробласты [1].

Согласно результатам наших исследований, эффекторные свойства нейтрофильных фагоцитов (ФЧ) у пациентов с нарушением остеогенеза не отличались от контрольных (таблица). При этом активность фагоцитоза (ФП) достоверно превышала значения контрольной группы.

Показатели врождённого иммунитета в сроки от 1,5 до 2 лет после травмы

Показатель	Замедленная консолидация костной ткани	Сращение перелома в оптимальные сроки
Нейтрофилы (10 ⁹ /л)	3,75 (3,6 – 4,31)	3,66 (3,24 – 3,81)
Фагоцитарный показатель (%)	↑91,0* (88,3 – 94,8)	87,5 (85,3 – 90,0)
Фагоцитарное число (у.е)	9,5 (8,0 – 13,8)	9,0 (8,0 – 9,0)
МП (СЦК)	↑2,3* (2,0 – 2,5)	2,0 (1,9 – 2,2)
КБ (СЦК)	↑2,3* (2,2 – 2,5)	2,1 (2,0 – 2,2)
НСТсп. (%)	↑9,0* (6,0 – 15,0)	4,5 (4,0 – 5,0)
НСТ стим. (%)	↑75,5* (69,0 – 80,0)	67,5 (58,3 – 72,0)
НВЛ (%)	↑3,0* (2,0 – 3,5)	1,0 (0 – 1,0)
Моноциты (10 ⁹ /л)	↑0,64* (0,53 – 0,72)	0,52 (0,45 – 0,67)
CD14+HLA-DR (%)	↓84,0* (81,6 – 86,8)	88,2 (85,9 – 90,3)

Примечание. * – p≤0,05 в сравнении с показателями пациентов у которых сращение было достигнуто в оптимальные сроки.

Вместе с тем, у пациентов с несвершенным остеогенезом наблюдалось повышение лизосомальной киллинговой активности нейтрофилов – содержание МП и КБ было достоверно выше, чем у пациентов с благоприятным исходом лечения.

Одним из аспектов регуляции костеобразования является активация кислородзависимого метаболизма в травмированных тканях [6].

На этом фоне вполне закономерно усиление продукции активных форм кислорода (АФК) клетками организма, в частности нейтрофилами. Увеличение интенсивности кислородзависимых метаболических процессов при нарушении остеогенеза было выявлено в НСТ – тесте, который был достоверно выше, чем у пациентов с благоприятным исходом лечения. Значения НСТ-стимулированного, позволяющего оценить функциональный резерв кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов, также были выше значений контроля.

Свои бактерицидные и цитотоксические функции нейтрофилы могут осуществлять путем классического фагоцитоза, но не меньшее значение для поддержания гомеостаза имеет и внешний киллинг – это недавно открытая (2004 г.) способность нейтрофилов образовывать сетеподобные структуры путем выброса во внеклеточное пространство нитей ДНК. Процесс формирования нейтрофилами внеклеточных ловушек является функцией альтернативной фагоцитозу, а возможно и более эффективной. Данный механизм внешней фагоцитарной активности нейтрофилов был до недавнего времени неизвестен и мало изучен, особенно у больных ортопедотравматологического профиля. Известно, что интенсивность образования НВЛ напрямую зависит от активности АФК и связана с величиной НСТ – теста [2].

Наши исследования показали достоверное увеличение количества нейтрофильных ловушек у больных с несросшимися переломами по сравнению с контролем.

В литературных источниках имеются указания на то, что моноциты также участвуют в регенерации костной ткани [5]. 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 острая травма, серьезные ожоги, острый панкреатит обширные хирургические вмешательства [6, 7].

Литературные сведения об экспрессии HLA-DR на моноцитах в условиях замедленной консолидации костной ткани в доступных литературных источниках отсутствуют. Полученные нами данные свидетельствуют об умеренном снижении способности моноцитов выполнять свою антигенпредставляющую функцию в группе с замедленной консолидацией костной ткани.

Заключение

Таким образом, при нормальной репаративной активности костной ткани через 7 – 18 месяцев после травмы основные показатели врожденного иммунитета находятся в пределах границ физиологической нормы. Замедленная консолидация костной ткани, обусловленная отсутствием стабильной фиксации, характеризуется умеренным снижением способности моноцитов экспрессировать на своей поверхности HLA-DR, усилением кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидной активности нейтрофилов и способности нейтрофилов к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек. 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.

Список литературы

1. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2001. – 277 с.
2. Долгушин И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, а. Ю. Савочкина. – М.: изд-во РАМН, 2009. – 208 с.
3. Исайкин А.И. Особенности ремоделирования костной ткани при стимуляции фагоцитов: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Екатеринбург, 2008. – 98 с.
4. Склянчук Е.Д., Зоря В.И., Гурьев В.В., Васильев А.П. Алгоритм хирургического лечения посттравматических нарушений костного сращения на основе локальной стимуляции остеогенеза / Центрально-Азиатский Медицинский Журнал. – 2009. – Т. XV, Приложение 3. – С. 281 – 282.
5. Ткаченко С.С. Остеосинтез. – Л.: Медицина, 1987. – 272 с.
6. Уразильдеев Р.З. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе ложных суставов длинных костей / Р.З. Уразильдеев, Г.А. Кесян, В.Н. Варфоломеев, В. Н. Штолько // Вестник ортопедии и травматологии им. Н. Н. Приорова. – 2013. – №2. – С. 54 – 58.
7. A strong association between down-regulation of HLA-DR expression and the late mortality in patients with severe acute pancreatitis / Y.P. Ho [et al] // Am J Gastroenterol. – 2006. Vol.101, № 5. – P.1117-1124.
8. Low monocytic HLA-DR expression and risk of secondary infection / A. Cheron [et al] // Ann Fr Anesth Reanim. – 2010. – Vol. 29, № 5. – P. 368 – 376.