

УДК 579.81:612.017.11:616.71-002.1

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА

Кузнецова Е.И., Розова Л.В.

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

В дооперационном периоде обследовано 52 пациента со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита нижних конечностей. Были проанализированы результаты микробиологического исследования патологического материала, фагоцитарно – метаболический статус нейтрофилов периферической крови. Показано, что основным возбудителем является *S. aureus*, который выделяется как в монокультуре, так и в ассоциации с другими микроорганизмами, а увеличение количества штаммов в микробных ассоциациях усиливает фагоцитарно – метаболическую активность нейтрофилов, а также способствует активации процесса образования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Ключевые слова: остеомиелит, *Staphylococcus aureus*, фагоцитарная активность нейтрофилов, нейтрофильные внеклеточные ловушки, миелопероксидаза

FEATURES OF INNATE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS DEPENDING ON THE MICROBIAL LANDSCAPE

Kuznetsova E.I., Rozova L.V.

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

In the preoperative period examined 52 patients with chronic posttraumatic osteomyelitis of the lower limbs. Analyzed the results of the microbiological examination of pathological material, phagocytic and metabolic status of peripheral blood neutrophils. The main pathogen is *S. aureus*, which stood out in monoculture and in association with other microorganisms, increasing the number of strains in microbial associations leads to an increase in phagocytic and metabolic activity of neutrophils, increases the number of neutrophil extracellular traps.

Keywords: osteomyelitis, *Staphylococcus aureus*, neutrophile phagocytic activity, neutrophil extracellular traps, myeloperoxidase

Проблема лечения ортопедо-травматологической патологии, осложненной хронической гнойной инфекцией, остается актуальной до настоящего времени.

Остеомиелит диагностируется после открытых переломов в 3–24% наблюдений и в 1–7% после оперативного лечения закрытых переломов. При этом рецидивы остеомиелита отмечаются у 20–30% больных, что приводит к функциональной неполноценности конечности в 10,3–57% наблюдений [2, 10].

Возникновение, развитие и течение гнойного процесса определяется сочетанием многих факторов, среди которых ведущим является взаимодействие защитных сил организма и проникших микробов. В настоящее время основными возбудителями хронического посттравматического остеомиелита являются монокультуры и ассоциации *Staphylococcus aureus* с грамотрицательными микроорганизмами [3].

Выявлена связь воспалительного процесса при остеомиелите с динамикой показателей естественной резистентности в тканях [5].

Влияние хронической инфекции на фагоцитарную активность нейтрофилов и лизоцимную активности сыворотки крови при

лечении методом чрескостного остеосинтеза остается малоизученным.

Целью настоящей работы явилась оценка неспецифического звена иммунитета у больных с хроническим остеомиелитом нижних конечностей в зависимости от выявленной микрофлоры.

Материалы и методы исследования

В дооперационном периоде обследовано 52 пациента со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита нижних конечностей в стадии обострения, находившихся на хирургическом лечении в клинике РНЦ «ВТО» им акад. Г.А. Илизарова в период с 2011 по 2013 гг. Возраст обследованных больных находился в пределах от 20 до 55 лет, длительность заболевания варьировала от 3 до 15 лет.

Были проанализированы результаты микробиологического исследования патологического материала. В качестве объекта исследования в работе было использовано отделяемое из ран, свищей (в дооперационном периоде). Микробиологические исследования выполняли традиционным методом посева на плотные питательные среды. Идентификация бактерий проводилась как в соответствии с общепринятыми рекомендациями, так и при помощи баканализатора «WalkAway-40 Plus» («Siemens») с использованием микротест – систем. Анализ данных исследуемых штаммов осуществлялся при помощи аналитической компьютерной программы WHONET 5,6.

Применялась стандартная методика изучения фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН), 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, %); количество активных фагоцитов (КАФ, (10⁹/л)); абсолютный фагоцитарный показатель (АФП, (10⁹/л)). 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 использовали мазки крови, окрашенные по Романовскому – Гимза. Учет ФАН производился при помощи световой микроскопии под иммерсией, исходя из 100 подсчитанных нейтрофилов.

Оценку лизоцимной активности сыворотки крови (ЛАСК) проводили по методике Стогний В. И. и соавт. Забор крови осуществлялся из локтевой вены натощак.

В качестве контрольных использовались иммунологические показатели 21 относительно здоровых добровольца из числа сотрудников в возрасте от 25 до 55 лет. Все лица, участвовавшие в исследовании дали информированное согласие на публикацию данных, полученных в результате исследования, без идентификации личности. На проведение клинических исследований получено разрешение комитета по этике ФГБУ «РНЦ» «ВТО им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России».

Полученные данные обрабатывались с помощью методов непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона и были представлены в виде $M \pm m$. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

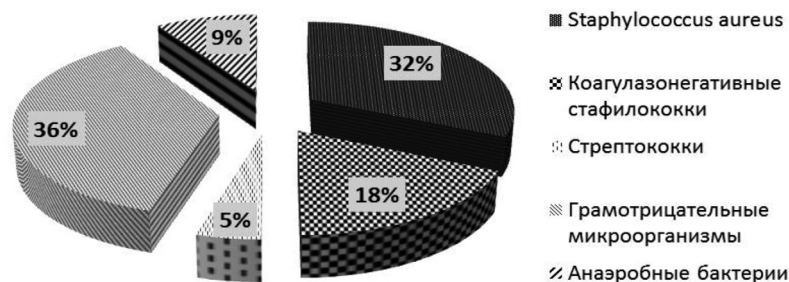
По результатам микробиологического исследования пациенты были распределены

на 2 группы. В I группе пациентов (n = 27) микробный пейзаж раневого отделяемого представлен монокультурой – *S. aureus*, во II группе (n = 25) – двух – трех компонентными ассоциациями микроорганизмов.

В ассоциациях микроорганизмов выявлен следующий видовой состав: стафилококки – *S. aureus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*; стрептококки – *Streptococcus intermedius*, грамотрицательные микроорганизмы – *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*; анаэробные бактерии – *Finogoldia magna*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* [рисунок].

Анализ полученных данных показал следующее: нейтрофилы в обеих группах независимо от микробного пейзажа показали высокую фагоцитарную активность ($p \leq 0,01$) по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Однако, наиболее выраженные изменения со стороны показателей ФАН отмечались в группе пациентов со смешанной микрофлорой в раневом отделяемом. У данной группы больных большинство исследованных показателей (ФП, ФЧ, КАФ, АФП) были достоверно выше, чем в контроле (табл. 1). В группе пациентов, у которых из ран высевались микробные ассоциации, наибольшую активность проявили кислородзависимые факторы бактерицидной активности нейтрофилов – миелопероксидаза и кислородные радикалы (НСТ – тест). Величина НСТ – теста в обоих вариантах у пациентов с ассоциациями достоверно превышала контрольные значения. Та же самая тенденция наблюдалась и в отношении кислородзависимой лизосомальной активности нейтрофилов – МП. Данный показатель во второй группе имел достоверные отличия не только с контролем, но и с первой группой, где в ранах превалировал золотистый стафилококк.



Микробный пейзаж раневого отделяемого у больных II группы

Таблица 1

Показатели неспецифической резистентности у больных хроническим остеомиелитом в зависимости от выявленной микрофлоры

| Показатель | I группа – <i>S. aureus</i> | II группа – микробные ассоциации | Контрольная группа |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|
| ФП (%) | 87,5 ± 1,70 | 91,6 ± 1,13 ⁺ | 71,0 ± 1,27 |
| ФЧ (у.е.) | 9,4 ± 0,65 ⁺ | 9,7 ± 0,64 ⁺ | 7,3 ± 0,18 |
| КАФ(10 ⁹ /л) | 4,4 ± 0,48 ⁺⁺ | 5,2 ± 0,70 ⁺⁺ | 2,3 ± 0,19 |
| АФП(10 ⁹ /л) | 45,2 ± 4,46 ⁺⁺ | 51,0 ± 4,11 ⁺⁺ | 24,0 ± 1,99 |
| НСТ спонт. (%) | 7,7 ± 1,52 | 8,4 ± 1,29 ⁺ | 5,6 ± 0,32 |
| НСТ стим. (%) | 71,0 ± 4,11 ⁺ | 76,0 ± 4,45 ⁺ | 54,0 ± 1,87 |
| МП(СЦК) | 2,0 ± 0,11 | 2,5 ± 0,10 ^{*+} | 2,1 ± 0,05 |
| КБ (СЦК) | 2,3 ± 0,06 | 2,3 ± 0,10 | 2,0 ± 0,04 |
| ЛАСК (%) | 83,3 ± 1,2 | 83,2 ± 2,7 | 83,8 ± 0,2 |
| НВЛ (%) | 5,1 ± 0,63 ⁺⁺ | 5,7 ± 1,42 ⁺⁺ | 1,0 ± 0,2 |

Примечание. + – $p \leq 0,05$, ++ – $p \leq 0,01$ – относительно показателей контрольной группы; * – $p \leq 0,05$ – относительно показателей I группы.

Кислороднезависимая лизосомальная активность нейтрофилов (КБ, ЛАСК) в обеих исследованных группах оставалась в пределах значений показателей контроля.

В обеих группах больных наблюдалось усиление недавно открытого механизма внеклеточного киллинга – образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Содержание НВЛ у больных с гнойной инфекцией значительно превысило контрольные значения. По количеству образуемых нейтрофильных ловушек достоверных различий между I и II группой не зафиксировано.

Интересные данные были получены при разделении II группы на подгруппы:

1) двухкомпонентные ассоциации – в состав которых входили стафилококки (в основном *S. aureus*) и грамотрицательные микроорганизмы (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*);

2) трехкомпонентные ассоциации – в их составе было выявлено не менее трех штаммов различных бактерий, обязательно присутствовал *S. aureus*, а так же встречались грамотрицательные бактерии (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*) и прочие микроорганизмы (*Streptococcus intermedius*, *S. warneri*, *Fingoldia magna*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*).

В обеих подгруппах наблюдались однонаправленные изменения показателей ФАН – эффекторная и метаболическая функции нейтрофилов находились на высоком уровне в сравнении с контролем (табл. 2).

Наибольшие достоверные отличия выявлены в отношении показателей лизосомальной активности нейтрофилов (МП,

КБ): у больных с 2 – х компонентными ассоциациями величина данных показателей значительно ($p \leq 0,01$) превышала контрольные значения.

Для обеих подгрупп была характерна высокая активность внешнего киллинга (образование НВЛ). Однако, у пациентов с 3 – х компонентными микробными ассоциациями способность к образованию ловушек была более выражена, чем в контроле и во 2 – й подгруппе.

По нашим данным, у больных остеомиелитом золотистый стафилококк высевался не только в монокультуре, а также присутствовал в большинстве ассоциаций наряду с грамотрицательной микрофлорой. Наши данные полностью согласуются с ранее проведенными исследованиями и с исследованиями других авторов [3, 7].

Важным этапом процесса фагоцитоза является киллинг поглощенных бактерий в фагоцитирующих клетках, обеспечивающийся кислородзависимыми и кислороднезависимыми механизмами, которые играют ведущую роль в уничтожении поглощенных микроорганизмов, и, в конечном итоге, в защите макроорганизма от инфекций [6].

Эффективность этих механизмов бактерицидности зависит от свойств микроба и условий его контакта с фагоцитом. Известно, что золотистый стафилококк, так и грамотрицательные симбионты, находящиеся с ним в выделенных ассоциациях, обладают рядом факторов, которые разрушают активные формы кислорода, а также обладают атилизосимной активностью и устойчивостью к катионным белкам. При фагоцитозе изменяется экспрессия многих генов золотистого стафилококка, в том числе повышается синтез токсинов [1, 9].

Таблица 2

Показатели неспецифической резистентности у больных хроническим остеомиелитом в зависимости от состава микробных ассоциаций

| Показатель | 2-х компонентные ассоциации | 3-х компонентные ассоциации | Контрольная группа |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| ФП (%) | 89,0 ± 0,99 ⁺⁺ | 94,2 ± 0,63 ⁺⁺ | 71,0 ± 1,27 |
| ФЧ (у.е.) | 8,8 ± 0,92 | 10,7 ± 0,63 ⁺ | 7,3 ± 0,18 |
| КАФ (10 ⁹ /л) | 6,2 ± 1,03 ⁺⁺ | 4,1 ± 0,24 ⁺ | 2,3 ± 0,19 |
| АФП (10 ⁹ /л) | 55,3 ± 7,82 ⁺⁺ | 46,8 ± 2,32 ⁺ | 24,0 ± 1,99 |
| НСТ спонт. (%) | 7,8 ± 1,65 | 9,2 ± 2,25 ⁺ | 5,6 ± 0,32 |
| НСТ стим. (%) | 80,4 ± 3,81 ⁺⁺ | 70,5 ± 7,71 ⁺ | 54,0 ± 1,87 |
| МП(СЦК) | 2,7 ± 0,06 ⁺⁺ | 2,4 ± 0,13 | 2,1 ± 0,05 |
| КБ (СЦК) | 2,4 ± 0,13 ⁺ | 2,1 ± 0,08 | 2,0 ± 0,04 |
| НВЛ (%) | 3,2 ± 0,40 | 8,2 ± 1,44 ^{***} | 1,0 ± 0,2 |

Примечание. * – p ≤ 0,05 относительно показателей больных с 2 – х компонентными ассоциациями; + – p ≤ 0,05, ++ – p ≤ 0,01 показателей контрольной группы.

Как показали наши исследования, фагоцитарный потенциал нейтрофилов у больных остеомиелитом был довольно высок, особенно кислородзависимые механизмы киллинга. Несмотря на это, заболевание продолжало прогрессировать [4].

Можно предположить, что при наличии достаточного количества бактерицидных факторов, нейтрофилы работают на пределе своих возможностей. Однако, микробы довольно легко разрушают большую часть образующихся активных форм кислорода и успешно инактивируют лизоцим и катионные белки [8].

Несмотря на это, нейтрофильные фагоциты пытаются до конца использовать весь свой арсенал для борьбы с инфекцией. Вторым защитным механизмом нейтрофилов является выделение содержимого гранул во внеклеточное пространство – образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Наибольший стимулирующий эффект на образование НВЛ оказали 3 – х компонентные ассоциации, тогда как большей киллинговой активностью, скорее всего, обладали НВЛ у пациентов с 2 – х компонентными ассоциациями. У данной группы в фагоцитах содержалось большее количество лизосомальных ферментов.

Выводы

Таким образом, проведенные лабораторные исследования показали, что у больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом длинных трубчатых костей основным возбудителем является *S. aureus*, который выделяется как в монокультуре, так и в ассоциации с другими микроорганизмами. Показано, что ФАН меняется в зависимости от видового состава микрофлоры. Проведенное сравнительное исследование позволило уста-

новить, что увеличение количества штаммов в микробных ассоциациях усиливает фагоцитарно – метаболическую и ловушкообразующую активность нейтрофилов. Комплексное исследование микробного пейзажа и факторов врожденного иммунитета может быть использовано для диагностики течения инфекционного процесса.

Список литературы

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Микробные ингибиторы лизоцима / О.В. Бухарин, А.В. Вальшев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 4. – С. 8–12.
2. Винник Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика / Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, А.А. Шагеев // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – № 6. – С. 12–15.
3. Гайдаш И.С. Микробиологический спектр условно-патогенных бактерий – возбудителей посттравматических остеомиелитов / И.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, С.В. Бирюкова и др. // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2000. – № 2. – С. 89–92.
4. Кузнецова Е.И. Функционально – метаболический статус нейтрофильных фагоцитов у пациентов с остеомиелитом длинных трубчатых костей / Е.И. Кузнецова, М.В. Чепелева, Н.М. Ключин, С.И. Бунашов // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – № 1. – С. 65–70.
5. Науменко З.С. Динамика изменения лизоцимной активности и содержание лактоферрина у больных хроническим остеомиелитом / З.С. Науменко, И.В. Шипицина, Л.В. Розова // Клиническая лабораторная диагностика – 2013. – № 6. – С. 16–18.
6. Пинегин Б.В. Нейтрофилы: структура и функция / Б.В. Пинегин, А.Н. Маянский // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374–382.
7. Розова Л.В. Изменение видового состава микрофлоры у больных хроническим остеомиелитом в процессе лечения // Гений ортопедии. – 2008. – № 2. – С. 92–95.
8. Слободчикова С.В. Влияние антител и цитокинов на эффективность фагоцитоза *Staphylococcus aureus*: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Пермь, 2014. – 122 с.
9. Liu G.Y. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity / G.Y. Liu, A. Essex, J.T. Buchanan, V. Datta, H.M. Hoffman, J.F. Bastian, J. Fierer, V. Nizet // The Journal of Experimental Medicine. – 2005. Vol. 202, № 2. – P. 209–215.
10. Wagner C. Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection / C. Wagner, K. Kondella, T. Bernschneider et al. // Shock. – 2003. – Vol. 20, № 6. – P. 503–510.