

© Группа авторов, 2004

**Динамика иммунологических и гематологических показателей при замещении дефектов длинных трубчатых костей в условиях отграничения их от мягких тканей аллотрансплантатом
(экспериментальное исследование)**

М.В. Чепелева, А.Н. Дьячков, С.П. Изотова, И.В. Ручкина, О.Л. Кармацких

***The dynamics of immunological and hematological indices in the process of filling defects of long tubular bones under their separation from soft tissues with an allograft
(Experimental study)***

M.V. Chepeleva, A.N. Diachkov, S.P. Izotova, I.V. Rouchkina, O.L. Karmatskikh

Государственное учреждение

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Эксперименты выполнены на 14 собаках, которым в условиях стабильной фиксации голени аппаратом Илизарова создавали сегментарные дефекты диафизов, протяжённостью 12-19 мм, изолированные от мягких тканей обработанной аллокостью. Комплексные исследования, включающие рентгенологический, гематологический и иммунологический методы, позволили получить объективную информацию о течении послеоперационного периода и регенерации костной ткани. Установлено, что при благоприятном течении репаративных процессов при замещении костных дефектов в условиях отграничения их аллотрансплантатом в периферической крови на фоне незначительного лейкоцитоза сохраняется нормальное содержание лимфоцитов и моноцитов, отсутствуют признаки Т-лимфоцитарной иммунодепрессии и палочкоядерный сдвиг лейкоцитарной формулы. Наиболее выраженные изменения гематологических и иммунологических показателей регистрируются с 14-х по 28-е сутки эксперимента, что рентгенологически совпадает с появлением первых признаков костного регенерата.

Ключевые слова: костный аллотрансплантат, периферическая кровь, Т-лимфоциты.

Experiments were made in 14 dogs which were subjected, under leg stable fixation with the Ilizarov fixator, to producing segmental shaft defects of 12-19 mm length, separated from soft tissues with a treated allobone. The complex studies made using x-ray, hematological and immunological methods allowed to obtain the objective data about the course of postoperative period and bone tissue regeneration. In case of favourable course of reparative processes during filling of bone defects under their separation with allografts normal amount of lymphocytes and monocytes was established to be maintained through slight leukocytosis in peripheral blood, moreover there were no signs of T-lymphocytic immunodepression as well as no shift of differential blood count relating to stab neutrophils. The most marked changes of hematological and immunological indices were registered from the 14-th to 28-th day of the experiment that coincided with the appearance of the first signs of regenerate bone by x-rays.

Keywords: bone allograft, peripheral blood, T-lymphocytes.

ВВЕДЕНИЕ

Биологические трансплантаты находят всё более широкое применение в травматологии, ортопедии и других областях восстановительной хирургии [1, 10-12]. Требования к трансплантации опорных (статических) тканей менее строги, нежели при пересадке жизненно важных органов (сердце, почки и др.). Аллогенные ткани, содержащие трансплантационные антигены, в организме реципиента вызывают защитную иммунологическую реакцию «хозяин против трансплантата». Эта защита направлена на

уничтожение введённых в организм генетически чужеродных тканей и состоит из ряда сложных иммунобиологических реакций. Пересаженная костная ткань подвергается не отторжению, а постепенному разрушению и замене вновь образованными тканями реципиента. Реакция несовместимости при пересадке опорных тканей не носит бурного характера и в основном проявляется или в виде быстрого рассасывания пересаженных тканей, или в медленной и недоброкачественной их перестройке. Общие проявления

встречаются редко и носят, как правило, стёртый характер [7].

В последние десятилетия предложен ряд методов ранней диагностики и прогнозирования исхода репаративного процесса костной ткани в ортопедии и травматологии. Они базируются на существующей биологической связи костеобразования и кроветворения и включают подсчёт

числа и анализ динамики клеточных элементов периферической крови [4, 8, 9].

Цель настоящего исследования - анализ динамики иммунологических и гематологических показателей при замещении дефектов длинных трубчатых костей, изолированных от мягких тканей аллотрансплантатом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 14 взрослых беспородных собаках. Операции выполняли в стерильных условиях под внутривенным барбитуровым наркозом. На голень накладывали аппарат Илизарова, скомпонованный из 4 опор. Из разреза мягких тканей длиной около 2 см пилой Джигли резецировали участок берцовых костей в средней трети диафиза протяженностью 12 – 19 мм (10-14 % длины голени). Между оставшимися фрагментами костей устанавливали тонкостенные трубчатые аллотрансплантаты. Их заготавливали из диафизов трубчатых костей в нестерильных условиях и помещали во флаконы с 1 % раствором формалина, которые хранили при комнатной температуре. Через 30 дней трубчатая аллокость, консервированная в растворе формалина была готова к применению.

Подсчёт числа лейкоцитов производили в камере Горяева. Для морфологического исследования периферической крови использовали окраску препаратов по Романовскому – Гимзе. Содержание эритроцитов и уровень гемоглобина определяли посредством фотоэлектрического эритрогеметра. Подсчёт числа ретикулоцитов осуществляли в мазке крови, окрашенном бриллианткрезиловым синим [6]. Содержание Т-клеток определяли на основе реакции спонтанного Е-розеткообразования. В пробирку вносили 0,05

клеточной суспензии и 0,05 мл 0,5% суспензии эритроцитов барана. Пробирки центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. и помещали на 1 час в холодильную камеру ($t = 14^{\circ}\text{C}$). После инкубации в пробы вносили 0,05 мл 1 % раствора глутаральдегида. После 20 минутного перерыва в пробирку добавляли 0,05 мл дистиллированной воды. Осадок аккуратно ресуспендировали и отмывали однократным центрифугированием. Розеткообразующие клетки (Е-РОК) изучали под микроскопом в световом режиме [2, 3].

Забор крови для иммунологических исследований производили до операции, через 7, 14, 28, 90 суток после оперативного вмешательства. Для анализа гематологической динамики собак обследовали в те же сроки и дополнительно – через 60 суток после операции.

Рентгенологические исследования проводили на 14, 28, 45, 60, 90-е сутки эксперимента.

Исследуемые гематологические и иммунологические показатели рассчитывали в относительных и абсолютных значениях. Контролем служили данные, полученные до операции. Статистическая обработка проводилась общепринятым способом с вычислением средней арифметической и ошибки средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов рентгенологических исследований показал, что в 92,9 % случаев (13 собак) было достигнуто замещение дефектов костей голени.

Картина периферической крови у этой группы животных выглядела следующим образом: через 7 суток после оперативного вмешательства отмечалось умеренное повышение общего числа лейкоцитов. Данный показатель превышал верхнюю нормативную границу. Параллельно наблюдалось умеренное снижение уровня гемоглобина. Достоверно увеличивалось абсолютное число моноцитов. Содержание лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, а также Т-лимфоцитов оставалось на дооперационном уровне (рис. 1, 2). Наиболее выраженные изме-

нения со стороны гематологических и иммунологических показателей были зарегистрированы через 14 суток после начала эксперимента. На фоне сохраняющегося лейкоцитоза наблюдалось дальнейшее снижение уровня гемоглобина, числа эритроцитов, повышение содержания ретикулоцитов в периферической крови. Относительное число лимфоцитов по сравнению с дооперационным периодом достоверно снижалось, не выходя при этом за пределы нормативных границ. В абсолютных числах содержание моноцитов, сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов было достоверно выше исходных значений. На этом этапе незначительно увеличивалось содержание Т-лимфоцитов (табл. 1, 2)

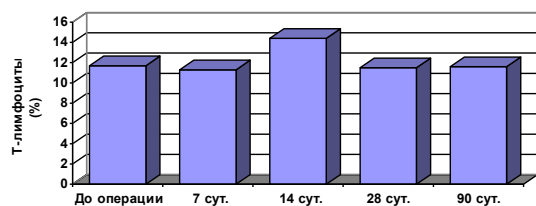
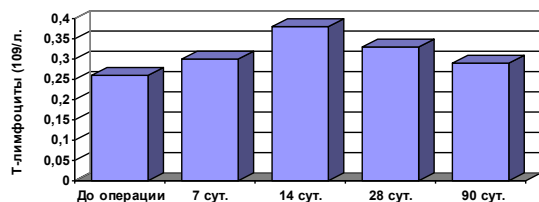


Рис. 1. Динамика Т- лимфоцитов (%)

Рис. 2. Динамика Т- лимфоцитов (10⁹/л)

На 14-е сутки эксперимента появлялись и первые рентгенологические признаки костеобразования. На рентгенограммах в проекции дефекта наблюдали слабые гомогенные тени проксимального и дистального костных отделов регенерата полусферической формы, растущих аппозиционно навстречу друг другу, при этом проксимальный отдел по высоте превышал дистальный. Тени аллотрансплантатов, изолирующих дефекты, имели ровные контуры.

На 28-е сутки эксперимента намечалась тенденция к нормализации уровня гемоглобина. Обращала на себя внимание динамика со стороны лимфоцитов: в процентном отношении данный показатель достигал исходных значений, а в абсолютных цифрах достоверно повышался по сравнению с дооперационным уровнем. Аналогичные изменения наблюдались в отношении моноцитов и сегментоядерных нейтрофилов (табл. 1, 2).

На рентгенограммах к этому сроку отмечался прирост проксимального и дистального костных отделов регенерата, проксимальный отдел по-прежнему имел большую протяженность.

В 45 дней костные участки формирующегося

регенерата почти сравнивались по протяженности, теряли гомогенный характер, становились более плотными по периферии, структура трансплантатов оставалась без изменений. К этому сроку у 2 животных произошло слияние проксимального и дистального костных отделов регенерата. Между костными фрагментами и аллокостью прослеживались четкие щели.

К 60-м суткам эксперимента нормализовалось содержание ретикулоцитов, несколько снизилось число лейкоцитов в периферической крови (табл. 1, 2). Проксимальный и дистальный костные отделы регенерата на этом этапе увеличивались и были практически одинаковыми по величине, а в их основаниях появлялись участки просветления, связанные с формированием костномозговой полости регенерата, при этом только у двух животных не произошло слияния костных отделов регенерата. Концы костных фрагментов и трансплантатов в местах соединения выглядели размытыми, щели между ними прослеживались, но не так отчетливо, как на предыдущем сроке.

На последнем этапе исследования (90-е сутки эксперимента) основные показатели гемограммы и Т-лимфоциты практически не отличались от дооперационных значений. Исключение составили сегментоядерные нейтрофилы, абсолютное содержание которых оставалось выше исходного уровня (табл. 1, 2, рис. 1, 2). На этом этапе эксперимента значительно большая часть диастаза была заполнена новообразованной костной тканью, слияние отделов регенерата произошло во всех наблюдениях, кроме одного. Во всех опытах обнаруживались признаки перестройки трансплантата, которая заключалась в потере четкости контуров его кортикальной пластинки, ее размытости и незначительном истончении. Щели между отломками костей и трансплантатом прослеживались с трудом.

Таблица 1

Динамика показателей лейкограммы (M±m)

Показатели	До операции	7 сут.	14 сут.	28 сут.	60 сут.	90 сут.
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	8,6±0,55	11,1±0,88*	12,4±0,96*	11,4±0,89*	10,7±1,19	9,7±0,71
Лимфоциты (%)	26,5±1,45	23,5±1,25	22,8±0,88*	25,5±1,05	25,1±1,32	25,9±1,03
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	2,2±0,18	2,4±0,17	2,1±0,21	2,7±0,13*	2,8±0,52	2,5±0,17
Моноциты (%)	5,0±0,46	6,1±0,78	5,6±0,32	5,5±0,41	5,3±0,49	4,7±0,42
Моноциты (10 ⁹ /л)	0,42±0,053	0,65±0,082	0,64±0,109*	0,61±0,077*	0,48±0,063	0,59±0,156
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	6,4±0,18	6,9±0,71	7,3±0,59	6,5±0,84	5,9±0,44	5,3±0,49
Палочкоядерные нейтрофилы (10 ⁹ /л)	0,52±0,038	0,55±0,089	0,79±0,107*	0,65±0,114	0,46±0,017	0,54±0,082
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	56,4±1,92	59,5±0,88	60,1±0,75	59,2±1,03	59,5±0,52	60,2±0,47
Сегментоядерные нейтрофилы (10 ⁹ /л)	4,61±0,282	6,1±0,341	6,8±0,798*	6,4±0,246*	6,1±0,749	5,8±0,454*
Эозинофилы (%)	5,1±1,12	4,3±1,29	4,3±0,94	3,7±0,71	4,3±0,89	4,1±0,72
Эозинофилы (10 ⁹ /л)	0,48±0,131	0,45±0,139	0,48±0,091	0,46±0,104	0,48±0,096	0,39±0,093

Примечание: * - p<0,05 различия достоверны по отношению к соответствующим показателям дооперационного периода.

Динамика показателей эритрограммы (M±m)

Показатели	До операции	7 сут.	14 сут.	28 сут.	60 сут.	90 сут.
Гемоглобин (г/л)	118,1±4,73	109,2±3,46*	106,3±2,86*	112,3±2,21	113,8±3,23	113,2±6,5
Эритроциты (10 ¹² /л)	5,2±0,12	4,6±0,16	4,4±0,14*	4,9±0,16	5,1±0,12	5,1±0,26
Ретикулоциты (‰)	2,1±0,19	2,6±0,29	3,2±0,29*	3,6±0,34*	2,5±0,19	2,1±0,26

Примечание: * - $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к соответствующим показателям дооперационного периода.

Ни у одного из животных этой группы не наблюдалось аллергических реакций и осложнений инфекционного характера. На протяжении всего эксперимента общее состояние собак оставалось удовлетворительным, функция смежных суставов сохранялась в полном объеме.

В одном случае не произошло заполнения

костного дефекта регенератом. Анализ картины периферической крови у этой собаки показал исходное повышение содержания лейкоцитов и палочкоядерный сдвиг лейкоцитарной формулы. Патологические изменения на гемограмме в послеоперационном периоде усилились и сохранялись до окончания эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие кроветворения и костеобразования при регенерации костной ткани осуществляется комплексом взаимосвязанных и хорошо сбалансированных клеточных и гуморальных механизмов, развивающихся как на уровне целого организма, так и локально – в области регенерирующей кости. Главный аспект такой связи заключается в возникновении и развитии ряда клеточных реакций крови и кроветворения системного характера. Он связан с изменением количества и функции лейкоцитов крови, а именно моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов – триады клеток, обеспечивающих развитие основных проявлений реактивности организма – воспаления и репарации. Существует чёткая фазовая зависимость между увеличением числа этих клеток, содержанием и деятельностью Т-лимфоцитов, с одной стороны, стадиями и особенностями клинического течения – с другой. Максимум обнаруженных изменений приходится на период формирования костного регенерата и последующей перестройки его в функционально полноценную кость [4, 5, 8]. Непосредственное участие моноцитов в регенерации кости связано с разнообразными патофизиологическими механизмами остеокластической резорбции новообразованных участков костной ткани, а также с выработкой этими клетками гуморальных индукторов остеогенеза. Не менее важна роль лимфоцитов в регенераторных процессах. Лимфоциты – активные участники репаративного костеобразования. Они вносят определённый вклад в иммунологические механизмы регенерации как за счёт кооперации Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, так и путём взаимодействия лимфоцитов с макрофагами. Лимфоциты участвуют в стимуляции кроветворения во вновь образованном костном мозге, а также в выработке медиаторов регенерации, в том числе и остеокластического фактора. Активное участие в регуляции регенераторного потенциала тканей принимают Т-лимфоциты. В

основные периоды остеогенеза возрастает число и повышается подвижность нейтрофилов периферической крови. В процессах костеобразования нейтрофилы выступают не только в роли основных клеточных элементов асептического воспаления, но и как источники биологически активных веществ. Выработанные в процессе асептического воспаления медиаторы и модуляторы могут быть индукторами репаративной регенерации [8].

В процессе замещения костных дефектов наблюдаются количественные изменения в содержании лимфоцитов, Т-лимфоцитов и моноцитов. Динамика показателей периферической крови на протяжении первой недели после операции позволяет косвенно судить о травматичности проведённого оперативного вмешательства. В частности, отсутствие выраженного лейкоцитоза, палочкоядерного сдвига, лимфо- и эритропении, снижения числа Т-лимфоцитов позволяет сделать вывод о щадящем характере операционной травмы. Первые рентгенологические признаки костной регенерации появляются на 14-28-е сутки эксперимента. Именно в этот период регистрируются наиболее значительные изменения исследуемых показателей. Наблюдаемая иммунологическая и гематологическая динамика носит благоприятный характер и свидетельствует о нормальном течении репаративных процессов в костной ткани.

Таким образом, при благоприятном течении регенераторных процессов при замещении костных дефектов в условиях отграничения их аллотрансплантантом в периферической крови сохраняется нормальное содержание моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, отсутствуют признаки Т-лимфоцитарной иммунодепрессии. Наиболее значительные изменения иммунологических и гематологических показателей регистрируются с 14-х по 28-е сутки эксперимента, что рентгенологически совпадает с появлением первых признаков костного регенерата.

Комплексные исследования, включающие рентгенологический, гематологический и иммунологический контроль, позволяют получить объективную информацию о динамике адапта-

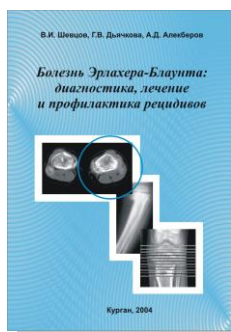
ционного процесса и регенерации костной ткани при замещении дефектов длинных трубчатых костей в условиях ограничения их аллотрансплантатом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аллотрансплантация формализованной костной ткани в травматологии и ортопедии / В.И. Савельев, Н.В. Корнилов, Д.Е. Иванкин, С.А. Линник. – СПб.: МОРСАР АВ, 2001. – 208с.
2. Иммунный статус больных при дистракционном остеосинтезе по Г.А. Илизарову и коррекция его нарушений: Пособие для врачей / МЗ РФ. Урал. НИИТО; Сост.: С.В. Гюльназарова, В.И. Мамаев, В.В. Базарный. – Екатеринбург, 1996. – 20с.
3. Лопатина, М.Ю. Иммуноморфологические показатели у собак разных возрастных и половых групп // Ветеринарная клиника. – 2002. – №11. – С.6-7.
4. Оценка течения репаративного остеогенеза: Метод. рекомендации / РНЦ «ВТО» им. Г.А.Илизарова; Сост.: Ю.П. Балдин, К.С. Десятниченко. – Курган, 1991. – 23 с.
5. Патологические механизмы регенерации: Метод. рекомендации / Свердловский гос. мед. ин-т; Сост.: А.В. Осипенко, В.В. Базарный, А.П. Ястребов. – Свердловск, 1991. – 20 с.
6. Риган, В. Атлас ветеринарной гематологии: Пер. с англ. Е. Махиянова / В. Риган, Т. Сандерс, Д. Деникола. – М.: ООО «АКВА-РИУМ ЛТД», 2000 – 136 с.
7. Ткаченко, С.С. К вопросу о «жизнеспособности» консервированных различными методами аллогенных костных трансплантатов // Ортопед., травматол. – 1983. – №8. – С. 69 -71.
8. Ястребов, А.П. Система крови и регенерация костной ткани / А.П. Ястребов, А.В. Осипенко. – Свердловск, 1990. – 124 с.
9. Ястребов, А.П. Регуляция гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов / А.П. Ястребов, Б.Г. Юшков, В.Н. Большаков. – Свердловск, 1988. – 153 с.
10. Horowitz, M.C. Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies / M.C. Horowitz, G.E. Friedlaender // Orthop. Clin. North. Am. – 1987. – Vol. 18, N 2. – P. 227-233.
11. Lanzer, W.L. Immunology for orthopedists / W.L. Lanzer // Arthroscopy. – 1987. – Vol. 3, N 3. – P. 141-151.
12. Stivenson, S. The immune response to osteochondral allografts in dogs / S. Stivenson // J. Bone Jt. Surg. – 1987. – Vol. 69-A, N 4. – P. 573-582.

Рукопись поступила 21.07.03.

Предлагаем вашему вниманию



В.И. Шевцов, Г.В. Дьячкова, А.Д. Алекберов

Болезнь Эрлахера-Блаунта: диагностика, лечение и профилактика рецидивов

Курган, 2003. – 169 с., табл. 10, ил. 80, библиогр.: 50 назв.

ISBN 5-89506-018-8

В монографии представлены данные о рентгеновской семиотике болезни Эрлахера-Блаунта с учетом стадии, типа течения заболевания, возраста пациента. Выявлена возрастная динамика процесса диспластической деструкции и рентгеноанатомические изменения в голеностопном суставе.

У 116 больных были изучены результаты лечения болезни Эрлахера-Блаунта, выявлены причины рецидивирования в зависимости от стадии заболевания, возраста больного, применяемой методики чрескостного остеосинтеза.

