

© Группа авторов, 2012

УДК 612.112:616.72-089.843-77

Функционально-метаболический статус нейтрофильных фагоцитов у пациентов с заболеваниями суставов перед первичным и ревизионным эндопротезированием

Е.И. Кузнецова, О.К. Чегуров, Б.В. Камшилов, А.В. Каминский, М.В. Чепелева

Functional-metabolic state of neutrophilic phagocytes in patients with articular diseases before performing primary and revision arthroplasty

Е.И. Kuznetsova, O.K. Chegurov, B.V. Kamshilov, A.V. Kaminskii, M.V. Chepeleva

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Российский научный Центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган
(директор – д. м. н. А.В. Губин)

С целью исследования функционально-метаболической активности нейтрофилов при подготовке к эндопротезированию и при развитии асептической нестабильности искусственного сустава обследовано 40 пациентов с остеоартрозом (ОА) коленного и тазобедренного сустава. Согласно полученным данным, в обеих группах наблюдается усиление функционально – метаболической активности нейтрофилов, при развитии асептической нестабильности эндопротеза на фоне активации фагоцитоза и усиления переваривающей функции фагоцитов начинает превалировать кислородзависимый метаболизм нейтрофильных фагоцитов. Следовательно, в отдаленные сроки после эндопротезирования крупных суставов наиболее диагностически значимыми становятся следующие показатели фагоцитарной активности нейтрофилов: ФП (фагоцитарный показатель), ФЧ (фагоцитарное число), ПЗФ (показатель завершенности фагоцитоза), НСТ-тест, КБ (cationные белки).
Ключевые слова: фагоцитарная активность нейтрофилов, остеоартроз, ревизионное эндопротезирование.

40 patients with the knee and the hip osteoarthritis (OA) have been examined in order to study neutrophil functional-metabolic activity when preparing to perform arthroplasty procedure and in case of the development of aseptic artificial joint instability. According to the data obtained, the intensification of neutrophil functional-metabolic activity is observed in both groups, oxygen-dependent metabolism of neutrophil phagocytes begins to dominate for the development of aseptic endoprosthesis instability through phagocytosis activation and enhancement of phagocytic digesting function. Therefore, in the long-term periods after large joint arthroplasty the following parameters of neutrophil phagocytic activity become the most significant diagnostically: PI (phagocytic index), PN (phagocytic number), IPC (index of phagocytosis completeness), HCT-test, CP (cation proteins).

Keywords: phagocytic activity of neutrophils, osteoarthritis, revision arthroplasty.

ВВЕДЕНИЕ

Главная задача эндопротезирования любого сустава – обеспечение его безболезненного и долговременного функционирования. Эндопротез представляет собой механическую систему, не обладающую способностью к саморегенерации, поэтому срок «выживания» большинства искусственных суставов ограничен, что связано с различными факторами, одним из которых является реакция иммунной системы на присутствие имплантата [1, 2].

Имплантация искусственного сустава у больных с остеоартрозом сопряжена с формированием иммунологического дисбаланса, способствующего развитию послеоперационных осложнений. Одним из наиболее частых и серьезных поздних осложнений эндопротезирования является асептическое расшатывание компонентов эндопротеза, которое, по литературным данным, достигает 30 % и требует ревизионного вмешательства [2, 4, 8].

Одной из причин возникновения асептического воспаления является миграция частиц износа про-

теза и костного цемента (дебриса) в окружающие ткани, в результате чего происходит приток фагоцитарных клеток (макрофагов и нейтрофилов) в зону имплантации [9,11]. Избыточная активация нейтрофилов оказывает повреждающее действие на ткани сустава при остеоартрозе, а также играет существенную роль в процессе резорбции на границе «кость – эндопротез» посредством выделения протеолитических и гидролитических ферментов, а также активных форм кислорода, способствуя дальнейшей дестабилизации компонентов эндопротеза [5, 7, 10]. Поэтому большую актуальность приобретает комплексное изучение функциональных особенностей нейтрофилов у больных с заболеваниями крупных суставов на этапах эндопротезирования.

Цель работы – исследование функционально-метаболической активности нейтрофилов при подготовке к эндопротезированию и при развитии асептической нестабильности искусственного сустава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 40 пациентов с остеоартрозом (ОА) коленного и тазобедренного суставов III ста-

дии в возрасте от 28 лет до 71 года, которым было выполнено первичное эндопротезирование. В

число обследованных лиц вошли 20 пациентов до эндопротезирования и 20 пациентов с развившейся через 2-7 лет после имплантации асептической нестабильностью. В качестве контрольных использовались иммунологические показатели 21 добровольца аналогичного возраста, у которых отсутствовали клинические проявления остеоартроза.

Забор крови осуществлялся из локтевой вены натощак.

Применялась методика изучения фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН), основанная на количественном определении поглотительной и переваривающей способности нейтрофилов по отношению к микробной тест-культуре (*Staphylococcus epidermidis*, штамм № 9198, НИИЭМ). Рассчитывались следующие показатели ФАН:

1. Фагоцитарный показатель (ФП) – процент нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе от общего их количества (норма – 65-100 %).

2. Фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число микробов, поглощенных одним нейтрофилом. Характеризует поглотительную способность нейтрофилов (норма – 6-14 у.е.).

3. Для оценки переваривающей функции нейтрофилов использовали индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) (норма: ≥ 1) и показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) (норма – 65-100 %).

4. Количество активных фагоцитов (КАФ) – абсолютное число фагоцитирующих нейтрофилов

(норма – 1,35-6,4 10⁹/л).

5. Абсолютный фагоцитарный показатель (АФП) (фагоцитарная емкость крови) – количество микробов, которое могут поглотить фагоциты 1 литра крови (норма – 20-100 10⁹/л).

6. Метаболическую активность нейтрофилов оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) методом световой микроскопии по методу Park, в двух вариантах: спонтанном и стимулированном.

7. 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) [6].

Для морфологического исследования использовали мазки крови.

Полученные данные обрабатывались с помощью методов непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона и были представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Факторный анализ проводили с помощью программного обеспечения AtteStat. Нормальность выборок определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для построения исходной корреляционной матрицы использовали коэффициент Пирсона [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ полученных данных показал следующее: у пациентов с остеоартрозом III стадии в дооперационном периоде абсолютное количество нейтрофилов и количественные показатели фагоцитоза не имели достоверных отличий от значений контрольной группы (табл. 1, 2). Значения НСТ-теста и катионных белков превышали контрольные, что в целом свидетельствовало об усилении бактерицидной активности нейтрофилов, связанной с накоплением продуктов разрушения костного матрикса в тканях сустава.

У пациентов с асептической нестабильностью в период подготовки к ревизионному вмешательству абсолютное количество нейтрофилов в периферической крови было выше, чем в контроле (табл. 1), не выходя при этом за пределы границ физиологической нормы. Относительное содержание активированных нейтрофилов (ФП) было достоверно выше, чем в контрольной группе и у пациентов с остеоартрозом. Вместе с тем усиливалась способность нейтрофилов к кислородзависимому киллингу, что нашло свое отражение в повышении ПЗФ, НСТ-теста (табл. 2). Уровень катионных белков и миелопероксидазы достоверно не отличался от значений контрольной группы.

Исследования, проведенные методом полимеразной цепной реакции, доказали присутствие различных видов ассоциированной микрофлоры в тканях, окружающих эндопротез. При этом, $\frac{3}{4}$ протезов, удаленных при ревизии, оказались инфицированными, тогда как традиционными мето-

дами выявлялось не более 10 % инфицированных имплантатов [12]. Опираясь на эти данные, мы предполагаем, что изменения фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов у пациентов с асептической нестабильностью имплантата связаны не только с поступлением продуктов износа эндопротеза в окружающие ткани, но и наличием персистирующей микрофлоры.

Более полное представление об изучаемых иммунологических показателях и стоящих за ними патологических процессах возможно получить с помощью специальной математической обработки результатов исследования.

Проведен факторный анализ у пациентов с остеоартрозом III стадии. Все показатели группировались в ряд факторов, расположенных в порядке уменьшения их вкладов в общую дисперсию. На основании варимаксного нормализованного вращения были выделены 4 фактора, имеющие наибольшую значимость и определяющие вариации ФАН на 83,45 % (табл. 3).

Фактор I, составляющий 31,37 % всех возможных состояний, объединил показатели, характеризующие функционально-метаболическую активность нейтрофилов (НСТ-тест спонтанный, индекс стимуляции НСТ-теста, миелопероксидазу). Обратная линейная зависимость была выявлена между спонтанным НСТ-тестом и индексом стимуляции НСТ-теста, что свидетельствует о сниженных резервных возможностях окислительной системы нейтрофилов.

Таблица 1

Количество нейтрофилов в периферической крови у больных с суставной патологией на этапах лечения

	Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	Нейтрофилы (%)	Нейтрофилы ($10^9/\text{л}$)
До эндопротезирования	7,3 (5,5÷7,5)	56 (51,5÷63,5)	3,4 (3,1÷4,1)
Асептическая нестабильность	6,5 (5,2÷8,0)	54,0 (52,0÷65)	3,8+ (2,8÷4,7)
Контрольная группа	5,7 (5,2÷6,2)	54,0 (48,5÷58,5)	3,1 (2,5÷3,7)

Примечание: + - $p<0,05$ - относительно показателей контрольной группы.

Таблица 2

Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови у пациентов с суставной патологией на этапах лечения (медианы и интерквартильные размахи)

	ФП (%)	ФЧ (у.е.)	КАФ ($10^9/\text{л}$)	АФП ($10^9/\text{л}$)	ИЗФ	ПЗФ (%)	НСТ-тест (спонт.) (%)	НСТ-тест (стим.) (%)	НСТ-тест, индекс стимуляции	МП, СЦК	КБ, СЦК
До эндопротезирования	77,0 ⁺ 70,0÷82,0	8,0+ 7,0÷10,0	2,6 2,3÷3,0	26,4 22,0÷38,0	1,8 1,6÷2,0	77,0 72,0÷87,0	8,0 ⁺ 7,75÷12,0	76,0 ⁺ 70,0÷81,3	9,0 5,9÷10,8	2,1 1,8÷2,3	2,3 ⁺ 2,2÷2,4
Асептическая нестабильность	87,0 ^{+,*} 74,3÷90,5	8,5 ⁺ 7,0÷9,25	3,1 ⁺ 2,0÷3,9	31,0 ⁺ 19,8÷39,0	1,7 1,6÷2,1	87,0 ⁺ 82,0÷90,0	9,0 ⁺ 7,0÷10,25	74,0 ⁺ 65,8÷80,0	8,5 6,2÷10,5	2,2 2,0÷2,5	2,1 2,0÷2,2
Контрольная группа	71,5 68,0÷77,3	7,3 7,0÷8,0	2,35 1,8÷2,8	24,0 20,0÷29,5	1,7 1,6÷1,8	82,0 80,0÷86,0	5,5 4,25÷8,0	57,0 48,0÷62,3	9,3 6,9÷9,25	2,0 1,9÷2,3	2,0 1,9÷2,2

Примечание: + - $p<0,05$ - относительно показателей контрольной группы; * - $p<0,05$ - относительно показателей, зарегистрированных до имплантации.

Таблица 3

Матрица факторных нагрузок показателей фагоцитарной активности нейтрофилов у больных остеоартрозом III стадии в дооперационном периоде

Показатели	Фактор I	Фактор II	Фактор III	Фактор IV
НСТ-спонтанный (%)	0,93			
Индекс стимуляции НСТ	-0,95			
Миелопероксидаза, СЦК	0,65			0,6
НСТ-стимулированный (%)		0,77		
Катионные белки, СЦК		-0,97		
Фагоцитарное число (у.е.)			0,94	
Абсолютный фагоцитарный показатель ($10^9/\text{л}$)			0,94	
Выделенные дисперсии (%)	31,37	23,74	17,37	10,97

Фактор II (23,74 % от общей дисперсии) влиял на способность нейтрофилов осуществлять цитотоксическую функцию по отношению к антигенному раздражителю. Обратная корреляция между НСТ-стимулированным тестом и содержанием катионных белков в нейтрофилах свидетельствовала о том, что при остеоартрозе активируются как кислородзависимые, так и кислороднезависимые механизмы киллинга.

III фактор составил 17,37 % вклада в общую дисперсию и объединил количественные показатели фагоцитарной активности нейтрофилов (КАФ и АФП).

IV фактор (10,97 % вклада в общую дисперсию) связан с миелопероксидазой, которая является ключевым ферментом при образовании ряда активных форм кислорода, а также играет ведущую роль в реализации биологической активности перекиси водорода.

Проведенный факторный анализ группы пациентов с асептической нестабильностью эндопротеза позволил выделить 5 значимых для рассмотрения факторов (из 11 основных), вклад которых в общую дисперсию составил 84,2 % (табл. 4).

Фактор I составил наибольший вклад в общую дисперсию – 41,1 %. Он объединил основные показатели активации нейтрофильных фагоцитов – ФП и ПЗФ.

Фактор II (18,8 % от общей дисперсии) связан с показателями, характеризующими функционально-метаболическую активность нейтрофилов – спонтанный НСТ-тест и индекс стимуляции НСТ-теста.

Факторы III, IV, V имели примерно равные вклады в общую дисперсию (8,91 %, 8,4 %, 7,0 % соответственно). Фактор III связан с переваривающей функцией нейтрофилов, IV фактор – с повышением количества активных фагоцитов, фактор V – с поглотительной способностью нейтрофилов.

Таблица 4

Матрица факторных нагрузок показателей фагоцитарной активности нейтрофилов у больных с асептической нестабильностью эндопротеза перед ревизионным вмешательством

Показатели	Фактор I	Фактор II	Фактор III	Фактор IV	Фактор V
Фагоцитарный показатель (%)	0,73				
Показатель завершенности фагоцитоза (%)	0,89				
Индекс завершенности фагоцитоза			0,97		
НСТ – тест (%)		0,94			
Индекс стимуляции НСТ		- 0,82			
Количество активных фагоцитов ($10^9 / \text{л}$)				0,70	
Фагоцитарное число (у.е.)					0,81
Выделенные дисперсии (%)	41,1	18,79	8,91	8,4	7,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты факторного анализа показали, что при остеоартрозе III стадии основными являются факторы, влияющие на состояние бактерицидной функции нейтрофилов, которая характеризуется активацией как кислородзависимых (НСТ-тест), так и кислороднезависимых (КБ) механизмов киллинга нейтрофилов.

В обеих группах наблюдается усиление функционально-метаболической активности нейтрофилов, что связано с общей направленностью действий иммунных клеток – инактивацией и элиминацией патогена,

независимо от природы его происхождения (продукты разрушения костного матрикса, частицы дебриса или микробные клетки). При развитии асептической нестабильности эндопротеза на фоне активации фагоцитоза и усиления переваривающей функции фагоцитов начинает превалировать кислород зависимый метаболизм нейтрофильных фагоцитов. Следовательно, в отдалённые сроки после эндопротезирования крупных суставов наиболее диагностически значимыми становятся следующие показатели фагоцитарной активности нейтрофилов: ФП, ФЧ, ПЗФ, НСТ-тест, КБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асептическое расшатывание бедренного компонента бесцементного эндопротеза. Основные причины: (обзор лит.) / Г.Л. Плоткин [и др.] // Травматология и ортопедия России. 2002. № 1. С. 87-94.
2. Бердюгина О.В. Иммунологическое прогнозирование в травматологии и ортопедии. Екатеринбург: ИздатНаукаСервис, 2009. 252 с.
3. Гайдышев, И. П. Анализ и обработка данных: спец. справ. СПб.: Питер, 2001. 752 с.
4. Иммунологические показатели при эндопротезировании тазобедренного сустава / А. В. Костюшко [и др.] // Тихоокеанский мед. журн. 1999. № 3. С. 55-56.
5. Корнилов Н.В., Новоселов К.А., Корнилов Н.В. Современные взгляды на этиопатогенез, принципы диагностики и консервативную терапию дегенеративно-дистрофических заболеваний коленного сустава // Травматология и ортопедия России. 2002. № 2. С. 47-59.
6. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. В. В. Меньшикова. М. : Медицина, 1987. 368 с.
7. Пингегин Б.В., Майнский А. Н. Нейтрофилы: структура и функция // Иммунология. 2007. № 6. С. 374-382.
8. Причины асептического расшатывания компонентов тотального эндопротеза тазобедренного сустава / Г. М. Кавалерский [и др.] // Врач. 2008. № 6. С. 49-51.
9. Состояние фагоцитарной активности и кислород зависимого метаболизма нейтрофилов крови больных деформирующим коксартрозом / С.О. Давыдов [и др.] // Бюл. СО РАМН. 2003. № 2. С. 114-117.
10. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo / I. R. Garrett [et al.] // J. Clin. Invest. 1990. Vol. 85, No. 3. P. 632-639.
11. Neutrophil-mediated cytotoxicity triggered by immune complexes : the role of reactive oxygen metabolites / J. R. Geffner [et al.] // Clin. Exp. Immunol. 1987. Vol. 69, No. 3. P. 668-675.
12. Gutow A. Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement // J. Bone Jt. Surg. Br. 2000. Vol. 82-B, No. 5. P. 776.

Рукопись поступила 01.03.12.

Сведения об авторах:

1. Кузнецова Елена Ивановна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, м. н. с. научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии.
2. Чегуров Олег Константинович – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующий лабораторией реконструктивного эндопротезирования и артроскопии, д. м. н.
3. Камшилов Борис Викторович – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующий травматолого-ортопедическим отделением № 7, к. м. н.
4. Каминский Андрей Владимирович – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующий травматолого-ортопедическим отделением № 8, к. м. н.
5. Чепелева Марина Владимировна – ФГБУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Минздравсоцразвития, клиническая лаборатория микробиологии и иммунологии, старший научный сотрудник, к. м. н.