© А.В. Балберкин С.В. Родионов, 1999

# *Особенности послеоперационного течения при операциях эндопротезирования на фоне различной активации нейтрофилов*

**А.В. Балберкин С.В. Родионов**

# *Peculiarities of postoperative process in endoprosthetic replacement through different activation of neutrophiles*

**A.V. Balberkin, S.V. Rodionov**

(ЦИТО им. Н.Н. Приорова. институт иммунологии, Москва)

В основе патогенеза многих острых послеоперационных осложнений лежит повреждение эндотелия сосудов свободными радикалами и другими факторами, образуемыми избыточно активированными нейтрофилами в зоне ишемии, т. е. в области операции. Изучение избыточного активирования в зависимости от травматичности операции и тяжести течения послеоперационного периода проводилось у 39 больных с опухолями, которым производили замещение суставных концов длинных трубчатых костей. Избыточное активирование нейтрофилов было достоверно отмечено у больных с затяжным течением послеоперационного периода, что и послужило основанием для применения лекарств, уменьшающих способность нейтрофилов накапливаться в очаге повреждения
Ключевые слова: эндопротезирование, активация нейтрофилов, фармакологическая коррекция.

Damage of vascular endothelium by free radicals and other factors formed by excessive activated neutrophiles in ischemic zone, i.e. operative zone is the basis of pathogenesis of many acute postoperative complications. Excessive activation depending on operation severity and postoperative course was studied in 39 patients with tumors who underwent the replacement of articular ends of long bones. Excessive activation of neutrophiles was trustworthily noted in patients with prolonged postoperative course that was the reason to apply the drugs decreasing neutrophile capacity for accumulation in damage focus.
Keywords: endoprosthetic, activation of neutrophiles, pharmacologic correction.

В основе патогенеза многих острых послеоперационных осложнений лежит повреждение эндотелия сосудов свободными радикалами и другими факторами, образуемыми избыточно активированными нейтрофилами (нф) [5]. Такое повреждение связано с особенно активным прилипанием большого числа нф в зоне ишемии, то есть в области операции. В дальнейшем могут поражаться и отдаленные органы, в первую очередь легкие [1, 2].

В норме нф избирательно прилипают к эндотелию сосудов легких, кишечника и отчасти селезенки, где они, покидая сосудистое русло, выходят в просвет органа и погибают. Начальные взаимодействия циркулирующих в крови нф с эндотелием в зоне ишемии носят обратимый характер, то есть после первых контактов нф катятся по эндотелию, потом снова выходят в кровоток [3]. При этом на их поверхности увеличивается число интегриновых адгезионных молекул Mac1 (состоят из двух полипептидных цепей CD18 и CD11b). Далее адгезионная молекула Mac-1, важный регулятор выброса свободных радикалов (так называемый детонатор кислородного взрыва), взаимодействует с эндотелием, этим заканчивается этап обратимых взаимодействий. Нейтрофилы распластываются и начинают проникать в глубокие слои сосудистой стенки. Этот сложный процесс сопровождается выбросом из нф ряда веществ, повреждающих окружающие клетки [2]. В физиологических условиях воздействие этих повреждающих факторов на собственные клетки уравновешено соответствующими ингибиторами, поэтому активированные нф проявляют бактерицидное действие и даже стимулируют регенерацию [4]. Но, как нередко бывает, физиологический процесс становится патологическим, если он происходит с большей интенсивностью или не в том месте или не в то время. При повышенном уровне рецепторов MAC 1 на поверхности нф происходит особенно интенсивное их взаимодействие с эндотелием с выбросом большого количества свободных радикалов [1].

Другим важным типом молекул на поверхности нф являются рецепторы для иммуноглобулинов G: агрегированных - CD16 и мономерных -CD64.

В последнее время получены данные о механизмах транспорта рецепторов и других моле-

кул из внутриклеточных депо на цитоплазматическую мембрану нф. Эти молекулы хранятся в цитоплазматических гранулах, которые в нф бывают четырех типов. Причем при первичных и обратимых взаимодействиях нф крови с эндотелием участвуют только так называемые секреторные везикулы, содержимое которых транспортируется на цитоплазматическую мембрану нф. Это вызывает быстрый (в течение 30'') подъем всех типов рецепторов на поверхности нф, которые находились внутри везикулы, что и определяется с помощью моноклональных антител. После окончательного прикрепления нф к эндотелию начинается процесс их проникновения в глубокие слои и выход в ткани (трансмиграция). В этом процессе принимают участие гранулы других типов. Важно отметить, что при исследовании нф крови удается проследить только начальный этап транспорта рецепторов, обусловленный секреторными везикулами. [8]

Синтез рецепторов нф, как и формирование их гранул, происходит в костном мозге в период миелопоэза. Некоторые молекулы, в том числе Mac1, CD16, синтезируются в костном мозге постоянно в значительных количествах, тогда как синтез других, например CD64, находящихся в тех же секреторных везикулах, определяется уровнем интерферона, фактора некроза опухоли, интерлейкина 1 и других цитокинов, синтез которых, в свою очередь, зависит от микробных продуктов, повреждения тканей и других стрессовых воздействий.

Рядом клинических работ продемонстрировано неблагоприятное прогностическое значение увеличения уровня CD11b и CD16 молекул на поверхности нф в ближайшем послеоперационном периоде [6]. По мнению других авторов, [9, 10] появление CD64 молекул на нф характеризует скрытую инфекцию в организме.

В этой связи нами была поставлена задача изучить уровень рецепторов CD11в , CD16 и CD64 на нф крови у больных до операции эндопротезирования, их динамику в ближайшем послеоперационном периоде и сопоставить полученные данные с особенностями клинического течения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение рецепторов нф проводилось у больных, которым выполнялись обширные резекции (5-17см) длинных трубчатых костей с замещением дефектов эндопротезами. Операции выполнены у 39 больных при опухолевом или диспластическом поражении костей. Эндопротезирование проксимального отдела бедра произведено у 16, дистального отдела бедра с коленным суставом - у 14, проксимального отдела большеберцовой кости с коленным суставом - у 7, плечевой кости - у 2 пациентов. Клинически у каждого больного оценивали в баллах травматичность операции и тяжесть течения послеоперационного периода. Критерии травматичности хирургического вмешательства приведены в таблице 1. Для определения степени травматичности операции суммарное число баллов для каждого больного делили на число учтенных показателей.

Таблица 1

Критерии травматичности операции

| Критерий | Число баллов | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Продолжительность операции, в мин. | до 60 | 61-90 | 91-140 | >140 |
| Кровопотеря, мл | до 150 | 151-500 | 501-800 | >800 |
| Переливание крови в мл | - | до 800 | 801-1200 | >1200 |
| Время наложения жгута | - | ≤60 | 61-80 | >80 |
| Степень сложности операции | 0 | 1 | 2 | 3 |

При оценке тяжести послеоперационного течения учитывали такие показатели, как отек оперированного сегмента, отек периферического отдела конечности, гиперемия вблизи послеоперационного шва, объем эвакуированной жидкости при пункции эндопротеза, температура тела, данные клинического анализа крови (таблица 2). Индекс тяжести послеоперационного течения (ИТ) определяли следующим образом: у больного в каждый срок исследования подсчитывали общее число баллов и делили его на число учтенных клинико-лабораторных показателей.

Таблица 2

Критерии тяжести послеоперационного течения

| Критерий | Число баллов | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Выраженность отека периферического отдела конечности | 0 | 1 | 11 | 111 |
| Объем экссудата при пункции области эндопротеза | 0 | ≤49 | 50-100 | >100 |
| Степень гиперемии вблизи операционного шва | 1 | 1 | 11 | 111 |
| Температура тела, С° | ≥36,9 | 37-37,9 | 38-39 | >39 |
| Hb, г/л | ≥110 | 109-81 | 80-71 | <71 |
| Лейкоциты х 10/л | 4-8 | 8,1-9,9 | 10-12 | >12 |
| Сегментоядерные нф, % | 47-72 | 73-75 | 76-80 | >80 |
| Палочкоядерные нф, % | До 6 | 6,1-9,9 | 10-14 | >14 |
| Лимфоциты,% | 20-35 | 35,1-41,9<br>15-19,9<br>11,1-13,9 | 42-44,9<br>10,1-14,9<br>14-15,9 | >45<br><10<br>>16 |
| Моноциты, % | 3-11 | 1-2 | | |
| СОЭ, мм/ч, мужчины | 4-8 | 8,1-24,9 | 25-40 | >40 |
| женщины | 4-15 | 15,1-24,9 | 25-40 | >40 |

Примечание. В случаях появления юных нф, плазматических клеток, анизоцитоза, пойкилоцитоза добавлялось дополнительно по 1 баллу.

Для исследования активности нф из гепаринизированной крови больных выделяли лейкоциты осаждением на желатине, затем избавлялись от эритроцитов 5-и минутной инкубацией в

гипотоническом растворе. Клетки инкубировали с ФИТЦ - мечеными моноклональными антителами к CD11b (одна из двух полипептидных цепей интегринового рецептора нф), к CD16 (рецептор к аггрегированному иммуноглобулину G) или к CD64 (рецептор к мономерному иммуноглобулину G) 30 мин. при 4° С. Контролем служили ФИТЦ - меченые моноклональные антитела, специфически не связывающиеся с нф.

На проточном цитофлюориметре FACSC определяли долю нф с числом соответствующих молекул, превышающих контрольный уровень. Этот показатель, характеризующий активацию НФ, выражали в процентах. Для моноклонов CD11b и CD16 исходные показатели активности нф варьировали у больных до операции, как и у здоровых доноров, поэтому для каждого больного рассчитывали индекс активации (ИА)- отношение процента активных нф в послеоперационном периоде к таковому до операции. Если происходила активация нф, то ИА превышал 1.

У здоровых доноров процент положительных CD64, по нашим данным, не превышал 6,6% (3,13+1,5), поэтому больший показатель считался отклонением от нормы.

Клинический анализ, как и иммунологические исследования, проводили до операции и затем на 1,3,5,7,10,15 и 20-е сутки после операции. В эти же сроки определяли индекс тяжести послеоперационного течения. Для сравнения средних чисел и расчета доверительного интервала использовали метод Стьюдента-Фишера для $p<0,05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В зависимости от особенностей послеоперационного течения больные были разделены на три группы: гладкое течение (1 группа), затяжное течение (2 группа) и в третью группу объединены больные, оперированные повторно по поводу различных гнойных осложнений после первой операции.

Первую группу составили 16 человек, максимальный ИТ у них не превышал 1,25 (0,91+0,12). Это отклонение от нормы (рис. 1а) быстро снижалось, и к 20 суткам ИТ у всех не превышал 0,33 (0,21+0,1). Никто из больных не имел в ближайшем послеоперационном периоде каких-либо осложнений.

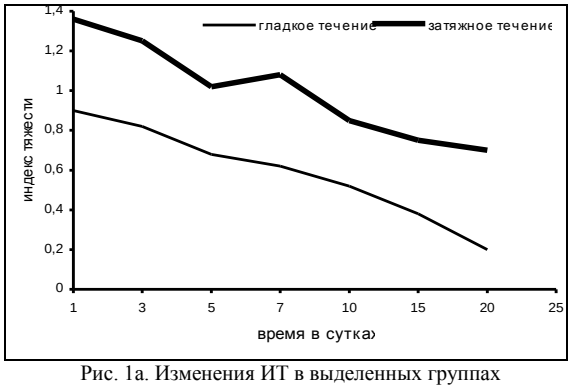


Рис. 1а. Изменения ИТ в выделенных группах

В группу с затяжным течением вошло 17 больных, часть из них имела хирургические осложнения (нагноение в области операции, тромбофлебит), а также длительное накопление экссудата в области эндопротеза, у других отмечалось обострение холецистита, гематологические отклонения. Для этой группы ИТ (рис. 1а) превышал 1,25 (1,37+0,116), он медленно снижался, составляя к 20 суткам не менее 0,5 (0,67+0,15).

У больных 3-й группы, имевших функционирующие свищи после ранее выполненного эндопротезирования (6 человек), ИТ был выше, чем в 1-й группе, но ниже, чем во 2-й (1,05+0,18). Его нормализация происходила медленно, и к 20 дню он все еще составлял 0,52+0,26 (рис. 1,б).

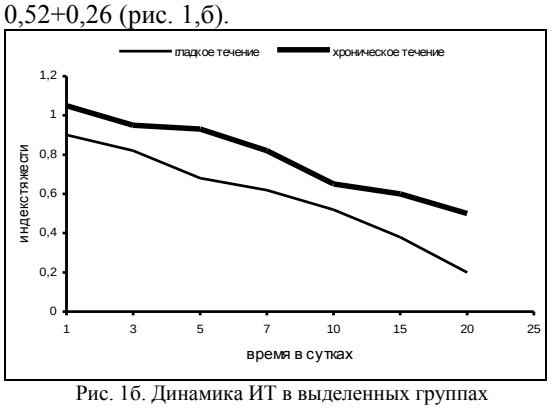


Рис. 1б. Динамика ИТ в выделенных группах

Оказалось, что степень травматичности хирургического вмешательства у больных с благоприятным течением была меньше по сравнению с затяжным течением: 1,075+0,14 балла против 1,8+0,38.

У всех больных с благоприятным течением на 1-е сутки после операции отмечалось снижение доли активных нф по обоим типам рецепторов (ИА = 0,42+0,15 и 0,42+0,16 по интегриновым и иммуноглобулиновым рецепторам соответственно) и далее, с некоторыми колебаниями, происходило медленное восстановление их исходного уровня. (Рис. 2 а,б).

В группе с затяжным течением доля активных нф на 1 и 3 сутки, судя по интегриновым рецепторам, увеличилась (ИА=1,42+0,18 и 1,89+0,38 соответственно). По иммуноглобулиновым рецепторам активация несколько запаздывала. ИА превышал 1 только на 3-и сутки, составляя 1,6+0,4. Далее, после некоторого падения на 5-е сутки следовал новый подъем ИА по обоим типам рецепторов на 7-10 сутки (рис.

2 а,б).

Что касается больных, поступивших с гнойными осложнениями для повторных операций, то на первые сутки у них по обоим типам рецепторов наблюдалось снижение ИА (0,73+0,38 и 0,7+0,26).В последующие дни ИА по интегриновым рецепторам существенно не изменялся (0,93+0,28), а по иммуноглобулиновым отмечалось некоторое его увеличение (1,15+0,33). (Рис. 2 в,г).

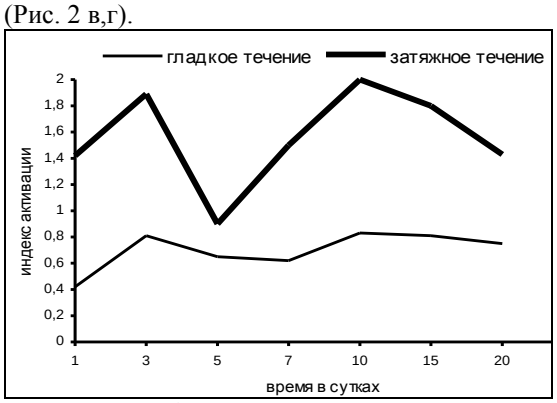


Рис. 2а. ИА нф интегриновым рецепторам при различном послеоперационном течении

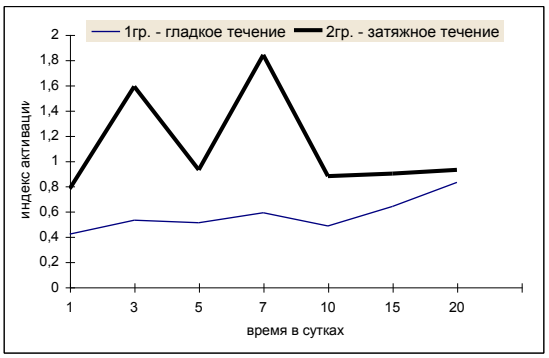


Рис. 2б. ИА нф по ммуноглобулиновым рецепторам при различном послеоперационном течении

Так как повышение доли положительных CD64 нф свидетельствует в пользу каких-либо неблагополучий в организме, в первую очередь связанных со скрытой инфекцией, то представлялось важным изучение этого показателя в исследуемых группах (табл. 3)

Оказалось, что из 7 обследованных в динамике больных из группы с гладким послеоперационным течением повышенный уровень положительных CD64 нф был отмечен лишь у двух. У одного из них эти изменения, выявленные до операции и резко увеличившиеся на 5-е сутки, мы связывали с клинически проявившейся в послеоперационном периоде кишечной инфекцией. У другой больной, оперированной повторно, повышенный уровень положительных CD64 нф был отмечен только на 15-е сутки. Каких-либо патологических изменений в организме в этот период нам выявить не удалось. Однако в анамнезе были указания на свищи после первой операции эндопротезирования (табл. 3).

У больных с неблагополучным течением, обследованных в динамике, повышение доли положительных CD64 нф имело место в 6 из 7 случаев. Нормальный уровень CD 64 нф сохранялся только у больного с остеогенной саркомой.

У больных, оперированных по поводу гнойных осложнений (3 группа), превышение доли положительных CD64 нф было в 5 из 6 случаев. На уровне нормы этот показатель оставался у больного с ретикулоклеточной саркомой, который до операции получил курс лучевой терапии.

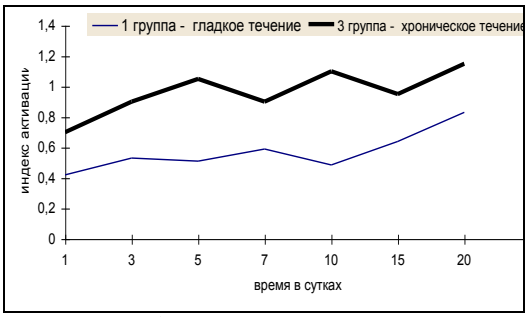


Рис. 2в. ИА нф по иммуноглобулиновым рецепторам в разные сроки после операции

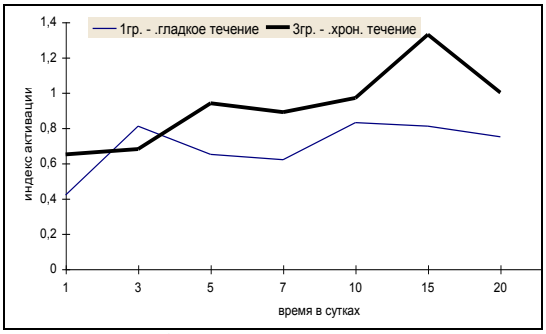


Рис. 2г. ИА нф по иммуноглобулиновым рецепторам в разные сроки после операции

## ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы взаимодействия циркулирующих в крови нф с эндотелием играют существенную роль в патогенезе многих заболеваний, в том числе и осложнений в ближайшем послеоперационном периоде. Рядом работ показано, что при абдоминальных и торокальных операциях, а также при множественной травме может развиться так называемый синдром системного воспаления с множественным поражением органов: легких, печени, почек и др., непосредственно не связанных с первичным повреждением. В этих случаях отмечается повышение доли активированных нф крови, судя по CD11b, CD16 и CD64 молекулам. [11, 6, 12, 14]. Разра-

ботка экспериментальных моделей, где на морских свинках, кроликах и прочих животных имитировали острую травму, ишемию мышц бедра и другие повреждения, позволила детально изучить патогенез синдрома системного воспаления. Одним из доказательств ведущей роли взаимодействий нейтрофилов с эндотелием явились данные о существенном ослаблении повреждения органов при предобработке животных антителами против адгезионных молекул (CD11b и других).[2].

С учетом этих данных можно предположить, что при операциях эндопротезирования, сопровождающихся ишемией большого объема мышечной ткани, подобные процессы могут иметь место в ближайшем послеоперационном периоде. Как видно из рис 2а,б, наиболее благоприятное послеоперационное течение сочеталось с падением доли активных нф. Напротив, такие осложнения, как нагноение, тромбофлебиты, обострение холецистита, происходили исключительно при повышенной доле положительных CD11b и CD16 нф.

Это согласуется с экспериментальными исследованиями, в которых показано, что нф накапливаются в поврежденных мышцах уже в течение первого часа после травмы, причем первыми в ткани выходят наиболее активные из них.

Поэтому увеличение доли активных нф на 1-3 сутки после операции следует считать неблагоприятным прогностическим признаком, что, возможно, связано с обширным повреждением или наличием микробных факторов.

Если в организме отсутствуют факторы, активирующие нф, то неактивные нф, выходящие в кровоток из костного мозга не успевают активироваться. Такая картина, сопровождающаяся падением доли активных нф (рис 2 а, б), соответствует гладкому послеоперационному течению, выявленному у наблюдаемых пациентов.

Отмеченное накопление большого количества экссудата (рис. 3), особенно на первые сутки после операции, на фоне повышенной активности нф согласуется с данными литературы о влиянии НФ на проницаемость сосудов. Так, выявлено [15], что липооксигеназные продукты (лейкотриены В4 и D4), секретируемые нф в зоне воспаления увеличивают проницаемость сосудов и вызывают отек. Возможно, именно этим можно объяснить повторное увеличение количества экссудата на 7-10-е сутки, которое совпало по времени с возрастанием количества активных нф.

Доля активных нф в крови зависит как от интенсивности выхода этих клеток в ткани и скорости притока новых нф из костного мозга, так и от времени, необходимого для достижения состояния активации (последнее прежде всего зависит от состояния эндотелия). Такая сложная кинетика затрудняет количественную оценку. Остается не вполне ясным, что же отражает доля активных нф крови. Поэтому для клинических исследований в последнее время разработаны новые подходы, основанные на определении молекул нф, которые в норме практически отсутствуют и начинают синтезироваться в процессе миелопоэза только при достаточном уровне определенных цитокинов в организме (интерферона, фактора некроза опухоли и пр.). На нф такими молекулами являются рецепторы к мономерному иммуноглобулину G. Маркером этих молекул служат моноклональные антитела CD64. Хотя эти рецепторы не принимают участия в процессах взаимодействия нф с эндотелием, отмечена их диагностическая и прогностическая значимость, особенно при грамотрицательных или стрептококковых инфекциях, а также у хирургических больных с различной патологией [9].

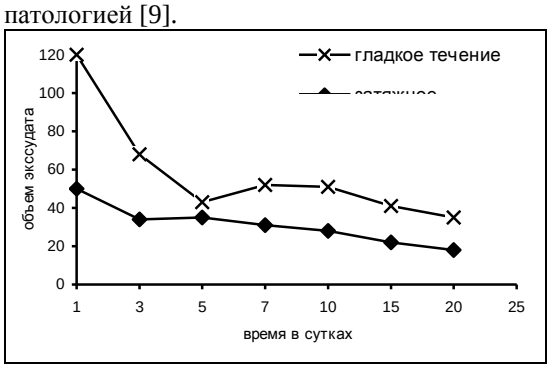


Рис. 3. Объем экссудата в различные сроки после операции

Наши данные подтверждают информативность этого теста, так как практически у всех больных с гладким течением до операции он был отрицательным (исключение составил 1 больной, у которого была выявлена кишечная инфекция). Напротив, у большинства больных с затяжным течением (у 4 из 7), как и у повторных с гнойными осложнениями (5 из 6), тест был положительным (табл. 3). Это подчеркивает информативность определения доли CD64 положительных нф для прогнозирования риска послеоперационных осложнений.

Выявленное затяжное послеоперационное течение на фоне увеличения количества активированных нф является, по нашему мнению, основанием для назначения препаратов, снижающих способность нф накапливаться в очаге поражения. К настоящему времени на экспериментальных моделях изучен целый ряд препаратов, способных предотвращать миграцию нф в ткани. Показано [1], что внутривенное введение моноклональных антител к MACl (так блокируются интегриновые рецепторы) снижает степень повреждения легких у морских свинок при экспериментальной травме мягких тканей и сепсисе. Разработан препарат тепоксалин - блокатор лейкоцитарной адгезии и воспаления.

Механизм его действия состоит в подавлении синтеза ряда адгезионных молекул на уровне транскрибции как на эндотелиальных клетках, так и на нф [17].

Кроме того, имеются первые клинические данные об использовании моноклональных антител и других антагонистов таких важных провоспалительных медиаторов, как фактор некроза опухоли и интерлейкин-1, для ослабления миграции и активации нф [16]. В настоящее время в клинике широко применяются препараты, способные снижать повреждающее действие нф на ткани, не влияя на их миграционные способности, например, ибупрофен, пентоксифиллин [12], ферментные препараты-вобэнзим и другие [14,15]. Есть все основания полагать, что в ближайшем будущем подобные фармпрепараты получат широкое применение и у больных после обширных резекций костей и эндопротезирования, при которых неизбежна значительная травматизация мягких тканей и избыточная активация нф.

ЛИТЕРАТУРА


1. Fabian T., Croce M.,.Stewart R. Nutrophil CD1 Expression and blockade after traumatic shock and endotoxin challenge //Ann.Surg. - 1994. - Vol.220. - P. 552-563.
2. Plasma activation of neutrophil CD18 after skeletal muscle ischemia: a potential mechanism for late systemic injury / P. Petrasek, T. Lindsay, A. Romaschin, P. Walker // Am. J. Physiol. - 1996. - Vol.270. - P. 1515-1525.
3. CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion / S. Stochs, M. Kerr, Ch. Haslett, I. Dransfield // J. Leuk. Biol. - 1995. - Vol.58. - P. 40.
4. Transforming growth factor - β1 inhibits production of IL8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium / W. Smith, L. Noack, Y. Khew -Goodull et al. // J. Immunol. - 1997. - Vol.157. - P. 360-368.
5. Asmuth E.J., Buurman W.A. Endothelial cell associated plated-activating factor (PAF), a costimulatory intermediate in TNF-induced H2O2 release by adherent neutrophil leukocytes // J.Immunol. - 1995. - Vol. 154, N 3. - P. 1383-1390.
6. Neutrophil and nonneutrophil mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion / R. Simpson, R. Alon, L. Kobrik, C. Robert // Ann.Surg. - 1993. - Vol.218. - P. 444-454.
7. Steadman R.,Retersen M.,Williams I. Human neutrophil secondary granule exocytosis is independent of protein kinase activation and is modified by calmodulin activity // Int.J.Biochem Cell Biol. - 1996. - Vol. 28. - P.774-786.
8. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils / H. Sengelov, P. Follin, L. Kjeldsen et al. // J.Immunol. - 1995. - Vol.154. - P. 4157-4165.
9. Herra C., Keane C., Whelean C. An increased expression of receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection // J. Med.Microbiol. - 1996. - Vol.44. - P. 135-140
10. Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increases number of type 1 IgG Fc receptors / P. Guyre, A. Scott, W. Kniffin, M. Fanger // J.Clin. Ivest. -1990. - Vol. 86. - P.1892.
11. Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response / C. H. Wakefield, P.D. Carey, S. Foulds et al. // Arch. Surg. – 1993. -Vol. 128, N 4. - P. 390-395.
12. Combined ibuprofen and monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuate hemodynamic dysfunction and sepsis-induced acute lung injury / P.G. Mullen, A.C. Windsor, C.J.Walsh et al. // J. Trauma. – 1993. – Vol. 34, N 5. – P. 612-621.
13. Heimburger M., Palmblad E. Effects of leukotriene C4 and D4 histamine and bradykinin on cytosolic calcium concentration and adhesiveness of endothelial cells and neutrophils // Clin.Exper.Immunol. - 1996. -Vol.103. - P. 454-460.
14. Мазуров В.И., Лила А.М., Стернина Ю.И. Системная энзимотерапия. - СПб.,1996.
15. Zhon L., Pope B., Chourmouris E. Tepoxalin locks neutrophil migration into cutaneous inflammatory sites by inhibing Mac-1 and E selectin expression // Europ.J.Immunol. -1996. - Vol 26. - P.120-129.


Рукопись поступила 10.02.1999.