

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНИЧЕСКОГО ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА

М.В. Чепелева, Н.М. Ключин

ФГБУ «РНИЦ» «Восстановительная травматология и ортопедия  
им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России  
директор – д.м.н. А.В. Губин  
г. Курган

Проведён сравнительный анализ показателей клеточного иммунитета у пациентов с хроническим остеомиелитом длинных костей в зависимости от стадии заболевания. Методом лазерной проточной цитометрии обследовано 30 больных со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита и 13 пациентов с хроническим посттравматическим остеомиелитом длинных костей в стадии ремиссии. Показано, что для хронического остеомиелита, независимо от стадии патологического процесса, характерен умеренный лейкоцитоз, повышение абсолютного количества моноцитов и нейтрофилов, увеличение числа CD25 и HLA-DR – позитивных Т-лимфоцитов. Стадия ремиссии у пациентов с хроническим посттравматическим остеомиелитом сопровождается умеренной активацией гуморального иммунитета (повышение количества В-лимфоцитов (CD19+) и продукции IgG). Снижение в периферической крови количества лимфоцитов, а также экспрессии HLA-DR на моноцитах создаёт предпосылки для развития свищевой формы остеомиелита и может служить показанием для применения препаратов иммуномодулирующего действия.

**Ключевые слова:** остеомиелит, клеточный иммунитет, CD-типирование.

## PECULIAR IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF CHRONIC POSTTRAUMATIC OSTEOMYELITIS

M.V. Chepeleva, N.M. Klyushin

*Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan*

A comparative study of cellular immunity parameters was performed in patients with long bone chronic posttraumatic osteomyelitis in regard to osteomyelitis stages. Thirty patients with the fistulous form of long bone chronic posttraumatic osteomyelitis and 13 patients with long bone chronic posttraumatic osteomyelitis in the remission stage were examined using laser flow cytometry. It was revealed that a moderate leukocytosis, increased monocyte and neutrophile absolute number as well as increased CD25 and HLA-DR-positive T-lymphocyte number are typical for chronic osteomyelitis regardless of the pathological process stages. The remission stage in patients with chronic posttraumatic osteomyelitis is accompanied by moderate activation of humoral immunity (increased B-lymphocyte (CD19+) number and increased production of IgG). The decrease in the peripheral blood lymphocyte number and well as reduction of HLA-DR expression on monocytes creates prerequisites for the development of fistulous osteomyelitis form and can be an indication for administering the preparations of immunomodulating action.

**Key words:** osteomyelitis, cell immunity, CD-typing.

### Введение

Процесс развития иммунного ответа на внедрение инфекционного агента сопровождается значительными изменениями субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток. Это относится к изменению их абсолютного количества, а также к появлению на клеточной поверхности определенных функциональных молекул. Под воздействием патогена клетки приспосабливаются к новым условиям и отвечают на это изменением экспрессии тех или иных мембранных и внутриклеточных маркеров, что является одним из эффективных механизмов иммунорегуляции [3].

В настоящий момент исследование фенотипа лимфоцитов при гнойно-воспалительных

заболеваниях находится на стадии накопления данных [2]. Сведения о состоянии клеточного иммунитета у пациентов с хроническим остеомиелитом немногочисленны и достаточно противоречивы. Вместе с тем, исследование поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток позволит выявить характерные иммунологические особенности остеомиелита на различных стадиях заболевания, уточнить патогенетические механизмы гнойно-воспалительного процесса, прогнозировать течение остеомиелита и в соответствии с этим корректировать терапевтические мероприятия.

**Цель** настоящей работы – провести сравнительный анализ показателей клеточного им-

мунитета у пациентов с хроническим посттравматическим остеомиелитом в зависимости от стадии заболевания.

### Материал и методы

В дооперационном периоде обследовано 43 пациента, находившихся на хирургическом лечении в клинике РНЦ «ВТО» им акад. Г.А. Илизарова в период с 2009 по 2011 г. Из них 30 у больных выявлена свищевая форма хронического посттравматического остеомиелита, в том числе бедра – 13, голени – 14, плеча – 3; 13 пациентов страдали хроническим посттравматическим остеомиелитом в стадии ремиссии: бедра – 6, голени – 6, плеча – 1. Возраст обследованных больных находился в пределах от 18 до 67 лет, длительность заболевания варьировала от 3 до 25 лет.

Типирование лимфоцитов периферической крови осуществлялось методом лазерной проточной цитометрии на цитометре «BECKMAN COULTER EPICS XL» (США) [4].

Т-лимфоциты (CD3+CD19-); Т-хелперы (CD3+CD4+); цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+); В-лимфоциты (CD3-CD19+); натуральные киллеры (NK) (CD3-CD16+CD56+); натуральные киллеры / Т-лимфоциты (NKT) (CD3+CD16+CD56+); CD3+HLA-DR, несущие маркеры поздней активации Т-лимфоцитов; CD3+CD25+, несущие маркеры ранней активации Т-лимфоцитов; CD14+HLA-DR, характеризующие экспрессию HLA-DR на моноцитах, идентифицировали с помощью моноклональных антител компании «Immunotech» (Франция), меченых FITC (изотиоционат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5), ECD (комплекс PE с техасским красным). В каждой пробе анализировали не менее 104 клеток. В качестве контрольных использовали иммунологические показатели 26 практически здоровых людей

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. Результаты исследования были представлены в виде медиан и интерквартильных размахов [1].

### Результаты и обсуждение

Содержание лейкоцитов у пациентов с остеомиелитом, независимо от стадии заболевания, достоверно превышало значения в контрольной группе (табл. 1). Относительное и абсолютное количество лимфоцитов в группе больных со свищевой формой остеомиелита было ниже ( $p \leq 0,05$ ), чем в группе с остеомиелитом в стадии ремиссии, хотя и не выходило за пределы нормативных границ. Абсолютное содержание гранулоцитов у пациентов с остеомиелитом было выше, чем в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ), что объяснялось увеличением количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов.

Содержание CD3+CD19- (Т-лимфоцитов) у пациентов с остеомиелитом не выходило за пределы границ физиологической нормы, субпопуляционные нарушения отсутствовали (табл. 2). Соотношение CD4 к CD8 в группе с остеомиелитом в стадии ремиссии составляло 1,58 (1,35–2,27), у пациентов со свищевой формой хронического остеомиелита – 1,93 (1,67–2,36). Содержание естественных киллерных клеток, реализующих свою цитотоксическую функцию, и NKT-клеток в исследуемых группах было нормальным.

Анализ активационных процессов в иммунной системе показал, что для хронического остеомиелита, независимо от стадии заболевания, характерен высокий уровень прироста в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации – CD25-антиген. Поэтому быстрое размножение и последующая дифференцировка наивных Т-клеток в зрелые формы у пациентов с хроническим остеомиелитом возможны не только в разгар инфекционного процесса, но и в период ремиссии.

Таблица 1

Показатели периферической крови

| Лейкоциты (10 <sup>9</sup> /л) | Лимфоциты (%)       | Лимфоциты (10 <sup>9</sup> /л) | Моноциты (%)    | Моноциты (10 <sup>9</sup> /л) | Гранулоциты (10 <sup>9</sup> /л) |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Контрольная группа:            |                     |                                |                 |                               |                                  |
| 5,6 (5,0–7,2)                  | 27,0 (26,0–32,0)    | 1,84 (1,6–2,2)                 | 7,0 (6,0–8,0)   | 0,4 (0,3–0,5)                 | 3,4 (2,9–4,2)                    |
| Остеомиелит, ремиссия:         |                     |                                |                 |                               |                                  |
| ↑7,8* (5,9–9,7)                | 34,0 (29,0–37,0)    | ↑2,6* (2,20–2,89)              | 8,0 (7,8–9,0)   | ↑0,7* (0,49–0,79)             | ↑5,2* (3,3–5,9)                  |
| Остеомиелит, свищевая форма:   |                     |                                |                 |                               |                                  |
| ↑8,5* (7,3–10,8)               | ↓25,0** (21,2–29,7) | ↓1,8** (1,5–2,3)               | ↑8,5* (8,0–9,8) | ↑0,72* (0,6–0,8)              | ↑5,3* (4,5–6,9)                  |

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  относительно показателей контрольной группы;

\*\* –  $p < 0,05$  относительно показателей в группе больных с остеомиелитом в стадии ремиссии.

Таблица 2

## Показатели клеточного иммунитета

|                             | CD3+CD19-<br>(Т-лимфоциты) | CD19+CD3-<br>(В-лимфоциты)              | CD3+CD4+<br>(Т-хелперы)        | CD3+CD8+<br>(цитотоксические Т-лимфоциты) |
|-----------------------------|----------------------------|---|--------------------------------|---|
| Контрольная группа          |                            |   |                                |   |
| %                           | 75,5 (73,2–78,1)           | 10,2 (8,1–11,9)                         | 47,7 (41,0–53,0)               | 24,7 (21,9–31,7)                          |
| 10 <sup>9</sup> /л          | 1,36 (1,21–1,66)           | 0,2 (0,15–0,24)                         | 0,9 (0,69–1,09)                | 0,4 (0,39–0,6)                            |
| Остеомиелит, ремиссия       |                            |   |                                |   |
| %                           | 73,5 (66,9–75,0)           | ↑14,3* (11,5–16,5)                      | 42,6 (38,6–49,9)               | 24,4 (20,5–31,0)                          |
| 10 <sup>9</sup> /л          | 2,0 (1,45–2,14)            | ↑0,39* (0,28–0,49)                      | 1,1 (0,87–1,49)                | 0,58 (0,43–0,87)                          |
| Остеомиелит, свищевая форма |                            |   |                                |   |
| %                           | 75,6 (71,5–81,1)           | ↓10,6** (7,8–13,8)                      | 45,0 (42,2–51,3)               | 25,6 (22,6–30,8)                          |
| 10 <sup>9</sup> /л          | 1,71 (1,53–2,35)           | ↓0,23** (0,15–0,32)                     | 1,1 (0,85–1,45)                | 0,58 (0,45–0,79)                          |
|                             | НК (натуральные киллеры)   | НКТ (натуральные киллеры - Т-лимфоциты) | CD3+HLA-DR (поздняя активация) | CD3+CD25+ (ранняя активация)              |
| Контрольная группа          |                            |   |                                |   |
| %                           | 11,5 (9,5–15,2)            | 2,8 (2,0–3,7)                           | 2,4 (1,9–3,7)                  | 3,8 (2,9–4,8)                             |
| 10 <sup>9</sup> /л          | 0,22 (0,18–0,29)           | 0,05 (0,04–0,07)                        | 0,04 (0,03–0,078)              | 0,07 (0,06–0,09)                          |
| Остеомиелит, ремиссия       |                            |   |                                |   |
| %                           | 11,6 (8,8–22,0)            | 3,5 (1,7–8,8)                           | ↑4,4* (3,2–5,4)                | ↑6,0* (4,9–8,1)                           |
| 10 <sup>9</sup> /л          | 0,32 (0,17–0,5)            | 0,078 (0,048–0,22)                      | ↑0,1* (0,074–0,15)             | ↑0,15* (0,11–0,23)                        |
| Остеомиелит, свищевая форма |                            |   |                                |   |
| %                           | 10,4 (6,6–16,1)            | 2,3 (1,6–3,4)                           | ↑4,1* (3,0–6,5)                | ↑5,9* (3,9–8,5)                           |
| 10 <sup>9</sup> /л          | 0,18 (0,14–0,42)           | 0,05 (0,03–0,08)                        | ↑0,1* (0,062–0,17)             | ↑0,15* (0,1–0,19)                         |

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  относительно показателей контрольной группы;

\*\* –  $p < 0,05$  относительно показателей в группе с остеомиелитом в стадии ремиссии.

Как известно, В-лимфоциты являются основным клеточным субстратом гуморального иммунного ответа, состоящего в выработке антител [4]. Каждый лимфоцит, относящийся к В-клеткам, запрограммирован на продукцию антител одной-единственной специфичности, и эти антитела присутствуют на его поверхности в качестве рецептора для соответствующего антигена. После взаимодействия рецептора с антигеном В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые секретируют иммуноглобулины [6, 7]. В периферической крови больных остеомиелитом в период ремиссии содержание В-лимфоцитов превышало значения контрольной группы и группы со свищевой формой хронического остеомиелита. Для более полной характеристики гуморального иммунного ответа был проведён анализ иммуноглобулинового профиля. Наиболее высокие значения сывороточного IgG были выявлены у пациентов с остеомиелитом вне обострения (контрольная группа – 7,2 (5,8 ч 14,1) мг/мл; остеомиелит в стадии ремиссии – 14,2 (10,9–16,5) мг/мл; свищевая форма остеомиелита – 9,5 (7,5–12,3) мг/мл). Концентрация сыво-

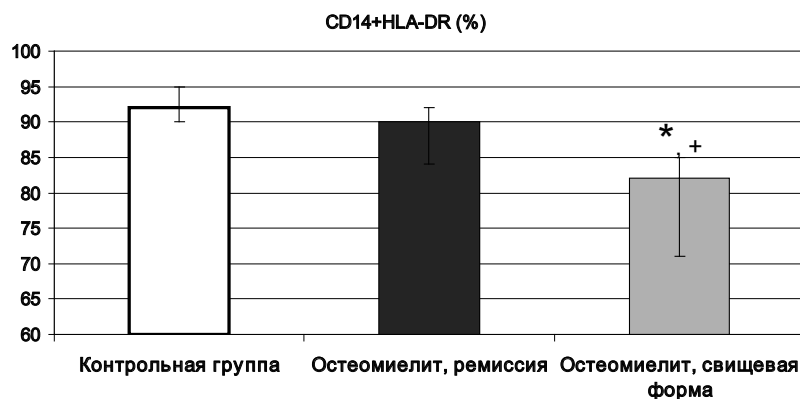
роточных иммуноглобулинов классов А и М в исследуемых группах не имела статистически значимых отличий. Полученные нами результаты позволили предположить, что в условиях хронической гнойной инфекции умеренная активация гуморального иммунного ответа (увеличение продукции CD19+CD3- и синтеза IgG) является одним из факторов, позволяющих сохранять нестойкий баланс между ремиссией и обострением.

HLA-DR принадлежит к молекулам главного комплекса тканевой совместимости класса II (МНС класс II), ответственным за представление антигена Т-клеткам. Повышение экспрессии HLA-DR на лимфоцитах происходит при инфекционных процессах под действием цитокинов и наблюдается при любых заболеваниях, связанных с воспалением. В обеих группах наблюдалось увеличение количества HLA-DR – позитивных Т-лимфоцитов. Моноциты у здоровых людей экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR в высокой плотности. Моноциты с уменьшенной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антиген

– представляющую функцию и не обладают способностью продуцировать воспалительные медиаторы в ответ на соответствующие стимулы. В свою очередь, уменьшение экспрессии HLA-DR на моноцитах коррелирует с увеличением риска инфекционных осложнений [5].

количества В-лимфоцитов (CD19+) и продукции IgG).

Снижение количества лимфоцитов, а также экспрессии HLA-DR на моноцитах создаёт предпосылки для развития свищевой формы остеомиелита и может служить показанием для применения препаратов иммуномодулирующего действия.



**Рис.** Содержание CD14+HLA-DR: 1 – контрольная группа; 2 – остеомиелит, ремиссия; 3 – остеомиелит, свищевая форма. + –  $p < 0,05$  относительно показателей контрольной группы; \* –  $p < 0,05$  относительно показателей в группе больных с остеомиелитом в стадии ремиссии

Экспрессия HLA-DR на моноцитах в контрольной группе и у пациентов с остеомиелитом в стадии ремиссии не имела статистически значимых отличий (рис.). В то же время у пациентов со свищевой формой остеомиелита данный показатель был достоверно ниже, чем в контроле и в группе с остеомиелитом в период ремиссии ( $p \leq 0,05$ ).

### Заключение

Сравнительное исследование поверхностных рецепторов иммунокомпетентных клеток позволило выявить иммунологические особенности хронического посттравматического остеомиелита на стадии ремиссии и при развитии свищевой формы заболевания.

Для остеомиелита, независимо от стадии патологического процесса, характерен умеренный лейкоцитоз, повышение количества моноцитов и нейтрофилов, увеличение числа CD25 и HLA-DR – позитивных Т-лимфоцитов.

Стадия ремиссии у пациентов с остеомиелитом сопровождается умеренной активацией гуморального иммунитета (повышение

### Литература

1. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных. СПб.: Питер; 2001. 752 с.
2. Сарап П.В., Винник Ю.С., Останин А.А. Клинические аспекты патогенетических влияний, определяющих состояние иммунной системы у пациентов с ургентной хирургической патологией. Бюл. сибирской медицины. 2011;(1):162-167.
3. Хайдуков С.В., Зурочкин А.В., ред. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. – Челябинск; 2008. 195 с.
4. Bouvet J.P., Zouali M. Silent antibodies. Rch. Inst. Pasteur (Tunis). 2005;82(1-4):3-8.
5. Docke W.D., Hofich C., Davis K.A., Rottgers K. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. Clin. Chem. 2005;51(12):2341-3247.
6. Schwartz-Albiez R., Monteiro R.C., Rodriguez M., Binder C.J., Shoenfeld Y. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. Clin. Exp. Immunol. 2009;158(1)43-50.
7. Welinder E., Ahsberg J., Sigvardsson M. B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return. 2011;23(5)335-340.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чепелева Марина Владимировна – к.м.н. старший научный сотрудник научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии

E-mail: office@ilizarov.ru;

Клюшин Николай Михайлович – д.м.н. заведующий научно-клинической лабораторией гнойной остеологии

E-mail: office@ilizarov.ru.

Рукопись поступила 06.02.2012