

ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПОСТОПЕРАЦИОННОГО ТЕЧЕНИЯ ИНТРАОРАЛЬНОЙ АУТОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

*Кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, кафедра гистологии
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Кубанский государственный медицинский университет»*

Министерства здравоохранения Российской Федерации

ГБОУ ВПО КубГМУ Минздравоохранения России,

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: tsimbal_OV@mail.ru

Проведено клиническое и цитохимическое исследование нейтрофильных гранулоцитов (НГ) раневого экссудата у больных с флегмонами челюстно-лицевой области (ФЧЛО) благоприятного и пролонгированного постоперационного течения и у пациентов на этапах интраоральной аутогенной остеотрансплантации. У больных изучаемых групп с ФЧЛО выявлена принципиально различная динамика цитохимических показателей цитоплазмы и активности хроматина НГ. Разработан новый тканевый индекс НГ, позволяющий получить прогностический показатель постоперационного течения. Подтверждена и доказана целесообразность применения разработанного предиктора при оценке прогноза интраоральной аутогенной остеотрансплантации.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, флегмоны челюстно-лицевой области, остеотрансплантация, прогностические показатели.

O. V. TSYMBALOV, A. A. EVGLEVSKIY

PROGNOSTICHERSKY MARKER OF THE POSTOPERATIONAL CURRENTS INTRAORALNOJ АУТОГЕННОЙ OF TRANSPLANTATION

*Chair of surgical stomatology and maxillofacial surgery,
histology chair Kuban state medical university,*

Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4. E-mail: tsimbal_OV@mail.ru

Clinical and cytochemical research of neutrophilic granulocytes (NG) in the wound exudate is made in patients with maxillofacial phlegmons favorably and prolonged treated and in patients at the stage of intraoral autogenic osteotransplantation. In the group of patients with maxillofacial phlegmons a fundamentally different dynamics of cytochemical data in cytoplasm and NG chromatine activity is identified. A new tissue NG index is developed, allowing to get prognostic data of postoperative treatment. Advisability of the predictor is confirmed and proved in evaluation of prognosis of intraoral autogenic osteotransplantation.

Key words: neutrophilic granulocytes, maxillofacial phlegmons, osteotransplantation, prognostic data.

В настоящее время для ремоделирования челюстной кости, утраченной вследствие инволютивной атрофии или травмы, применяют аутогенную костную пластику [1]. Чаще в качестве донорского трансплантата используют кость нижней челюсти как наиболее близкую по эмбриональному происхождению, что обуславливает высокую целевую эффективность. Техника предполагает амбулаторные условия, отсутствие общего обезболивания, наименьшие эстетические естественные потери в области забора материала, наличие одного врачебного сертификата и т. д. Однако достаточно часто, несмотря на тщательно соблюдаемый хирургический протокол, остеорегенерация может непредсказуемо осложняться атипичным течением раннего постоперационного периода, развитием неадекватного воспалительного ответа, что может неблагоприятно отразиться на течении остеогенеза de novo в целом. Индивидуальных маркеров, способных предвосхитить характер раннего постоперационного течения, обусловить необходимость подключения антибактериальной и других видов терапии, к сожалению, еще не существует.

Тем не менее в литературе представлены сведения о попытках использования в качестве подобных предикторов состояние нейтрофильных гранулоцитов (НГ) [3, 5, 6].

НГ первыми из иммунокомпетентных клеток мигрируют в очаг повреждения, независимо от его асептической или инфекционной природы, с предназначением распознавания, связывания и элиминации чужеродного антигена [4, 8–10]. НГ являются не только клетками-«камикадзе». Они обладают полноценными иммунорегуляторными свойствами, способны к экспрессии генов и синтезу цитокинов с запуском при необходимости всего иммунологического механизма [4, 9, 10]. Интегральным показателем микробицидного и цитотоксического потенциала НГ могут быть состояние ядерного хроматина НГ и уровень цитоплазматических полимеров. Снижение уровня оптической плотности ядерного хроматина свидетельствует о явлениях его деспирализации (реструктуризации), сопровождающихся ослаблением химических связей комплекса «ДНК – гистон» в ядрах клеток [7, 8]. Подобные явления указывают на биологическую активацию хроматина, матричной активности ДНК, последующего белкового синтеза и в целом функциональной активности НГ. Однако, несмотря на ряд проведенных исследований [3, 5, 6], данная концепция нуждается в дополнительных клинических фактах ее подтверждения.

Цель исследования – разработать предиктор раннего постоперационного течения на этапах аутогенной остеотрансплантации путем изучения цитохимических особенностей нейтрофильных гранулоцитов раневого экссудата у больных с благоприятным и пролонгированным течением ФЧЛО и у пациентов, нуждающихся в костной трансплантации.

Материалы и методы исследования

Материалом служили мазки-отпечатки раневого экссудата у больных с ФЧЛО (1-я группа – 60 пациентов) и крови из реципиентной зоны трансплантации (2-я группа – 25 человек). ФЧЛО, захватывающие 2–3 клетчаточных пространства, одонтогенной природы характеризовались среднетяжелым типичным неосложненным течением. Больные получали стандартное общее и местное противовоспалительное лечение, осуществлялось вскрытие гнойного очага традиционным подходом. Больные 1-й группы дифференцировались на 2 подгруппы. Критерием разделения – благоприятное и пролонгированное течение – служил срок наложения вторичных швов (НВШ). 1а группу составили 30 пациентов, НВШ которым проводили до 7 суток. 1б группу (30 человек) – пациенты, НВШ у которых проводили в срок, превышающий 7 суток. Пациенты 2-й группы были соматически здоровы, безотягощающего анамнеза. Атрофия челюстной кости была обусловлена резорбцией альвеолярной кости вследствие потери зубов. Локальный стоматологический статус предполагал санированную полость рта, отсутствие воспалительных явлений. Донорской зоной служил подбородочный симфиз. Из донорского трансплантата готовился расщепленный блок, который фиксировался титановыми винтами к реципиентной зоне. Отсутствие объемной конгруэнтности компенсировалось микстом из измельченной оставшейся губчатой кости и синтетического остеопластического материала «Osteon II» с величиной гранул 0,25–0,5 мкм. Операционная рана укрывалась биодеградируемой мембраной «Collagen membrane», которая адаптировалась к поверхности и иммобилизовывалась. Костный дефект донорской зоны также возмещался «Osteon II» и закрывался резорбируемой мембраной «Collagen membrane». Для предотвращения натяжения слизисто-надкостничного лоскута последний мобилизовался путем рассечения надкостницы. Операционная рана реципиентной зоны ушивалась фторполимерной нитью «Гортекс», донорская зона – ПГА. Забор цитологического материала у больных 1-й группы проводили трижды: в момент вскрытия флегмоны, на третьи сутки от начала лечения и во время НВШ, а также в момент выкраивания слизисто-надкостничного лоскута реципиентной зоны. Клиническое наблюдение больных 2-й группы в рамках проведения данного исследования проводилось ежедневно до снятия операционных швов и дискретно на всех этапах неоosteогенеза. Для определения уровня реструктуризации хроматина НГ мазки-отпечатки раневого экссудата и крови операционной раны наносили на обезжиренные предметные стекла, фиксировали ацетон-этанолом (соотношение 1:1) и параами 40%-ного формалина по 15 и 5 мин соответственно, окрашивали толлуидиновым синим при pH 5,0, а также по Фельгену на ДНК: окрашенные отпечатки подвергали абсорбционной фотометрии на установке ФЭМЛ-1а (ЛОМО) методом двух площадей по Гарсия (1969) [2] при длине волны 530 нм; катионный белок (КБ) выявляли по

В. Е. Пигаревскому (1975), миелопероксидазу (МП) – по J. Sato и C. Selkija (1928), гликоген (Г) – по A. G. E. Pearse (1961). Изучение уровня оптической анизотропии проводили с помощью поляризационного микроскопа МП-8 полуколичественным методом G. Astaldi и L. Verga (1957), модифицированным для исследования ядра [3]. Полученные результаты цитохимических исследований у больных после проведенных костных трансплантаций хранились в зашифрованной форме до полного окончания периода остеогенеза. После чего общая когорта пациентов 2-й группы была дифференцирована на 2 подгруппы: с оптимальным течением ранозаживляющего процесса – 2а группа, в которой операционные швы снимали в срок до 8 суток, и 2б группа, в которой операционные швы снимали, соответственно, позже. После чего вскрывалась зашифрованность исследования, проводились анализ и обработка полученных данных. Все результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием программы «Statistica-6».

Результаты исследования и обсуждение

Постоперационный период после вскрытия ФЧЛО был удовлетворительным в обеих группах. На следующие сутки после операции больные были активны, могли самостоятельно передвигаться по отделению и принимать пищу, для них был характерен стабильный гемодинамический профиль. Однако в 1а группе сроки сохранения инфильтрации, экссудации и время появления молодых грануляций в ране были значительно короче. Явные общие и местные клинические признаки стабилизации и купирования гнойного процесса, превалирование пролиферативных процессов в ране над альтеративными позволили уже через $5,84 \pm 0,72$ сут. производить НВШ. В 1б группе НВШ осуществлялось в среднем через $10,76 \pm 1,33$ суток ($p < 0,05$). Средняя длительность пребывания в стационаре больных 1а группы составила $12,7 \pm 2,42$ сут., 1б группы – $17,6 \pm 1,83$ сут. ($p < 0,05$).

У больных 1б группы, у которых наблюдался более пролонгированный период до НВШ по сравнению с 1а группой, были выявлены достоверное перманентное увеличение уровня цитоплазматических биополимеров и снижение активности хроматина ядра к 3-м суткам курации и к НВШ. Активность структуризации хроматина НГ соответственно срокам исследования составила $1,31 \pm 0,09$; $1,23 \pm 0,06$ ($P < 0,05$) и $1,28 \pm 0,08$ усл. ед. ($P > 0,05$). При этом содержание КБ соответственно равнялось $1,7 \pm 0,05$; $2,11 \pm 0,03$; $2,98 \pm 0,4$ усл. ед. ($P < 0,01$) соответственно. Содержание Г в описанные сроки составило $1,51 \pm 0,12$; $2,03 \pm 0,07$; $2,82 \pm 0,05$ усл. ед. ($P < 0,01$) соответственно. Активность МП – $0,95 \pm 0,04$; $1,4 \pm 0,04$; $1,9 \pm 0,06$ усл. ед. ($P < 0,01$). Выявляемость ДНК НГ, окрашенных по Фельгену, распределилась по срокам следующим образом: $0,81 \pm 0,001$; $0,67 \pm 0,002$ и $0,48 \pm 0,001$ усл. ед. ($P < 0,01$) соответственно.

Изучение уровня оптической плотности хроматина ядер НГ раневого экссудата у больных 1а группы показало, что он снижался к 3-м суткам наблюдения, вновь увеличивался к НВШ. Содержание КБ – $1,4 \pm 0,11$; $0,87 \pm 0,14$; $1,96 \pm 0,18$ усл. ед. ($P < 0,01$). Содержание Г в описанные сроки равнялось $1,54 \pm 0,12$; $1,43 \pm 0,07$; $1,99 \pm 0,05$ усл. ед. ($P < 0,001$). Активность МП изменялась аналогичным образом и составила $0,91 \pm 0,08$; $0,6 \pm 0,05$; $1,6 \pm 0,06$ усл. ед. ($P < 0,001$). Выявляемость ДНК НГ, окрашенных по Фельгену, распределилась по

срокам следующим образом: на момент вскрытия она оказалась равной $0,78 \pm 0,01$ усл. ед., через трое суток равнялась $0,96 \pm 0,002$, на момент НВШ – $0,87 \pm 0,001$ усл. ед. ($P < 0,001$).

Следовательно, у больных с явной тенденцией к быстрому выздоровлению уже на третьи сутки после вскрытия гнойного очага наблюдаются усиление расхода КБ, МП и Г (в цитоплазме НГ снижается их содержание) и существенная деспирализация хроматина НГ. В дальнейшем по мере снижения экссудативных явлений и очищения раны описанные эффекты становятся менее выраженными, однако даже в период НВШ НГ экссудата остаются частично активированными, о чем свидетельствует в большей степени окраска по Фельгену на ДНК. При этом величина содержания КБ, Г, активность МП восстанавливаются и даже превышают уровень, обнаруженный при вскрытии гнойного воспалительного очага. Пролонгированное разрешение гнойного процесса ассоциировано со сниженной активностью ядерного хроматина, снижением расходования КБ, МП и Г.

Разнонаправленная, но взаимосвязанная динамика цитохимических показателей ядра и цитоплазмы НГ у больных 1а и 1б групп предопределила необходимость получения представления об интегральной характеристике функциональной активности НГ раневого экссудата при ФЧЛО. С этой целью нами был разработан тканевый индекс нейтрофильных гранулоцитов (ТИНГ). Последний выражается в условных единицах и определен как отношение интенсивности окрашиваемости ДНК к сумме концентраций КБ, Г и активности МП, выявляемых при фотометрии в единицах оптической плотности: $ТИНГ = (ДНК / (КБ + МП + Г)) \cdot 1000$, где 1000 – коэффициент, для удобства преобразующий тысячные доли в целые числа. Правомерность такого подхода к определению интегральной функциональной активности клеток закономерно вытекает из классического правила Гертвига – ядерно-цитоплазматического соотношения. При использовании данного коэффициента интегральная активность НГ раневого экссудата у больных с благоприятным типом течения ФЧЛО составила при вскрытии флегмоны $202,07$ усл. ед.; на 3-и сутки – $331,03$ усл. ед.; при НВШ – $156,76$ усл. ед. У больных 1б группы соответственно $193,78$ усл. ед., $121,60$ усл. ед. и $62,34$ усл. ед. Следовательно, интегральная величина повышения общей биологической активности НГ, приводящая к активации тканевого пула НГ, отражающая активацию хроматина НГ, сопровождающаяся усилением расходования микробицидных компонентов их цитоплазмы и повышением расхода энергетических запасов клетки, может служить предиктором благоприятного прогноза постоперационного течения. Данный тезис был подтвержден у пациентов на этапах остеотрансплантации и неоостеогенеза.

Группу больных (2б группа) со сроком снятия операционных швов более 8 суток составили 7 (28%) человек, что было обусловлено наличием выраженной гиперемии и отеком окolorаневых тканей. Из-под линии швов определялась серозно-геморрагическая экссудация в умеренном объеме. У 2 больных (8%) характер серозной экссудации сменился на гнойный, что

потребовало введения мягких дренажей. Воспалительные явления сопровождались жалобами пациентов на болезненные ощущения в области реципиентной зоны трансплантации, дискомфорт, повышение температуры. Особенности в течении раневого процесса в области донорской зоны выявлено не было. Всем больным 2б группы был назначен курс антибиотикотерапии, нестероидные противовоспалительные препараты, увеличена частота антисептической обработки. Операционные швы у всех больных были состоятельны вплоть до момента их снятия. Местное и общее противовоспалительное лечение позволило купировать ранние воспалительные проявления и обеспечить дальнейший адекватный остеогенез. Величина ТИНГ во 2а группе в интраоперационном периоде оказалась равной $224,12$ усл. ед., в группе 2б – $106,24$ усл. ед. Диапазон временного интервала до снятия швов во 2б группе составил от 9 до 15 дней и коррелировал с отрицательной корреляционной связью с величиной ТИНГ ($КК = -0,67$).

Таким образом, величина ТИНГ, отражающая интегральную биологическую активность тканевого пула НГ, может служить предиктором раннего постоперационного течения, в частности, при планировании общего объема хирургического протокола костно-пластических операций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альфаро Ф. Э. Костная пластика в стоматологической имплантологии. – М.: Азбука, 2006. – 235 с.
2. Гарсия А. и Ирио Р. Одноволновой метод двух площадей, применяемый для цитофотометрии мазков и отпечатков тканей // В кн.: Введение в количественную цитохимию. – «М., МИР, 1969. – С. 196–201.
3. Евглевский А. А. Способ прогнозирования течения раневого процесса // Патент на изобретение № 2146367, опубликовано 03.10.2000.
4. Нестерова И. В., Евглевский А. А., Фомичева Е. В. Особенности активационного потенциала ядер нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии // Цитокины и воспаление. – 2004. № 3 (2). – С. 52–55.
5. Цымбалов О. В., Беляев Д. Л., Евглевский А. А., Демченко В. А. Лейкинферон – индуцированная динамика цитохимических показателей ядра и цитоплазмы нейтрофильных гранулоцитов раневого экссудата у больных с флегмонами челюстно-лицевой области // Стоматология – 2004. – № 4. – С. 42–45.
6. Цымбалов О. В., Неделько Н. А., Евглевский А. А., Демченко В. Н. Способ оценки течения и прогноза развития гнойных ран при флегмонах челюстно-лицевой области // Патент РФ на изобретение № 2233449. – Бюл. № 21.
7. Эренпрейса Е. А., Сондоре О. Ю., Зирне Р. А. Конформационные изменения хроматина опухолевых клеток и феномен ядерной ахромазии // Эксперим. онкология. – 1988. – № 10. – С. 54–57.
8. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // Blood. – 1997. – Т. 15. № 89 (10). – С. 3503–3521.
9. Cassatella M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils // J. immunol. – 1995. – № 16 (1). – P. 21–26.
10. Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y. et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli // J. leukoc. biol. – 2004. – № 75 (2). – P. 358–372.

Поступила 13.05.2013