

ЦИТОМЕТРИЯ НЕЙТРОФИЛОВ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ОСТЕОМИЕЛИТОМ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

И.А. Василенко¹, А.А. Никитин², Н.В. Малыченко², И.А. Иванюта¹, В.Б. Метелин¹, Б.Я. Агаджанян¹

¹ГУ Институт ревматологии РАМН

²ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Методом компьютерной лазерной морфометрии изучены особенности морфофункционального состояния нейтрофилов больных остеомиелитом нижней челюсти до операции и в динамике послеоперационного периода. Установлено, что при остеомиелите наблюдается дисбаланс в составе циркулирующей популяции нейтрофилов, связанный с появлением клеток, обладающих модифицированными цитоморфологическими характеристиками, что свидетельствует о функциональной недостаточности антимикробной защиты организма. Лечение оксидом азота в послеоперационном периоде способствует быстрой нормализации показателей клеточного звена неспецифической резистентности.

Ключевые слова: цитометрия, нейтрофилы, неспецифическая резистентность, остеомиелит нижней челюсти.

CYTOMETRY OF NEUTROPHILS FOR EVALUATION OF COMPLEX TREATMENT EFFICIENCY IN PATIENTS WITH MANDIBULAR OSTEOMYELITIS

I.A. Vasilenko¹, A.A. Nikitin², N.V. Malichenko², I.A. Ivanjuta¹, V.B. Metelin¹, B.J. Agadzhanian¹

¹State Institute of Rheumatology of RAMS

²M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI)

The features of morphofunctional status of living neutrophils in patients with mandibular osteomyelitis were investigated before surgery and in dynamics of post-operative period using the method of computed laser morphometry. Unbalanced circulating neutrophil population due to production of cells with modified cytomorphologic parameters was revealed which is indicative of the functional failure of antimicrobial defence of the organism. NO-therapy was established to contribute to the rapid normalization of cell unit indicants of nonspecific resistance.

Key words: cytometry, neutrophils, nonspecific resistance, mandibular osteomyelitis.

Лечение одонтогенных воспалительных заболеваний, предупреждение развития деструктивных форм остеомиелита челюстей, а также профилактика и лечение инфекционно-воспалительных осложнений переломов костей лицевого черепа, главным образом травматического остеомиелита, — актуальные проблемы современной клинической челюстно-лицевой хирургии. С одной стороны, постоянно ухудшающиеся экологические условия, и невысокий уровень жизни населения приводят к росту числа больных с исходно измененной иммунологической реактивностью и наличием фоновой патологии. С другой, бесконт-

рольное массовое применение доступных антибиотиков способствует широкому распространению внутри лечебных учреждений и среди городского населения микробных штаммов, резистентных к химиотерапевтическим препаратам. Клиническая картина остеомиелита нижней челюсти также претерпела значительные изменения: увеличился удельный вес больных с торпидным атипичным течением заболевания, при котором традиционное лечение не приводит к купированию гнойно-воспалительного процесса в костной ткани, и он приобретает затяжной характер с периодически обострениями [4, 6, 7].

При остеомиелитах клинические проявления, как правило, развиваются на фоне истощения и дезинтеграции компенсаторных иммунологических гомеостатических механизмов. Поэтому так важна разработка современных методов диагностики и прогнозирования инфекционно-воспалительных процессов, которые отражали бы состояние неспецифической системы защиты организма.

Еще одна немаловажная проблема — необходимость поиска новых методов и средств патогенетической терапии в комплексном лечении остеомиелита. В последние годы для этих целей широко используются методы физико-химической медицины: непрямоое электрохимическое окисление крови и внутривенное лазерное облучение крови, высокая эффективность которых в купировании эндотоксикоза была подтверждена при самых разных, в том числе и хирургических, стоматологических заболеваниях [2].

Известно, что мощным биологически активным фактором, который участвует в регуляции многих жизненно важных функций, в том числе процессов тканевой трофики, является оксид азота (NO). Его роль в пато- и саногенезе различных патологических состояний (инфекции, воспаления, опухолевого роста, иммунных нарушений и др.) убедительно доказана [3, 5]. Благодаря этому, препараты, стимулирующие внутритканевой синтез NO, нашли в последние годы активное применение в медицине. В нашей стране было впервые разработано оригинальное устройство «Плазон», производящее потоки экзогенного NO, пригодного для использования в лечебных целях. Имеется опыт его применения при терапии гнойных ран и трофических дефектов для снижения выраженности воспалительных проявлений и ускорения периода заживления [5].

Исходя из изложенного, использование воздушно-плазменных NO-содержащих газовых потоков для лечения больных с остеомиелитами нижней челюсти представляется весьма перспективным. Мы не ставили целью подтвердить известные факты. По нашему мнению, задача выбора критериев, позволяющих объективно оценить эффективность практического применения NO-терапии, является наиболее важной. Используемый в настоящей работе метод

компьютерной цитометрии позволил осуществить экспресс-диагностику степени изменения витального морфофункционального состояния нейтрофилов периферической крови у больных с остеомиелитами и оценить эффективность применения экзогенного оксида азота в комплексном лечении данного заболевания.

Под наблюдением находились 30 пациентов: 18 больных с одонтогенным и 12 — с травматическим остеомиелитом нижней челюсти. Возрастной диапазон обследованных больных составил от 18 до 70 лет (средний возраст $38,7 \pm 1,6$ лет). Критериями включения в исследование служили наличие у пациента клинически установленного и рентгенологически подтвержденного диагноза остеомиелита, необходимость в проведении операции, согласие пациента.

По характеру проведенного лечения обследованные больные были разделены на две группы методом простой рандомизации. Основную группу составили 15 человек (средний возраст $39,1 \pm 2,1$ лет), в комплексное лечение которых дополнительно были включены процедуры NO-терапии, группу сравнения — 15 больных (средний возраст $36,8 \pm 2,7$ лет), получавших в постоперационном периоде традиционное лечение: воздействие широкополосным электромагнитным полем от аппарата «ЭЛБИ» 10 минут ежедневно, всего 5-8 процедур в зависимости от тяжести состояния, начиная с первых суток после операции; транскутанное инфракрасное лазерное облучение крови в области магистральных сосудов шеи от аппарата «Стандарт» мощностью до 10 мВт с частотой 80 Гц по 10 минут с двух сторон, ежедневно, всего 5-10 процедур.

В качестве источника плазменных и NO-содержащих газовых потоков, генерируемых из атмосферного воздуха, использовали аппарат «Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКВП/NO-01 ПЛАЗОН®». NO-терапия проводилась ежедневно в послеоперационном периоде со 2-3-го дня, в течение 5-7 дней, после антисептической обработки раны.

Для определения нормы нами были изучены показатели нейтрофилов практически здоровых лиц (20 человек) — добровольцев мужского пола. Доноры с существенными отклонениями в общеклинических и биохимических анали-

зах крови из исследования исключались. Средний возраст в группе здоровых лиц составил $39,2 \pm 1,8$ лет.

Обследование пациентов, поступивших в стационар, проводилось по общепризнанным правилам, включая оценку и анализ динамики клинических проявлений и данных комплекса инструментально-лабораторных исследований. Все больные получили полный объем стационарной медицинской помощи, включающий хирургическое лечение, антибактериальную, противовоспалительную и симптоматическую терапию.

Для выполнения поставленных в настоящей работе задач были изучены морфофункциональные показатели нейтрофильных гранулоцитов (НГ) периферической крови. Из локтевой вены осуществляли забор крови в объеме 3,0 мл. НГ выделяли стандартным методом на двойном градиенте плотности (1,077 и 1,093). Клетки отмывали центрифугированием в растворе Хенкса. Надосадок сливали, нейтрофилы разводили раствором Хенкса до концентрации 2×10^6 .

Прижизненную оценку морфофункционального состояния клеток проводили с помощью метода компьютерной фазовой морфометрии на базе отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (МГИРЭА, Москва) [1]. Комплексный алгоритм цитометрии обеспечивал автоматическое определение заданных размерных параметров отдельных НГ (диаметр, периметр, высота, площадь, объем), обработку данных на популяционном уровне и документирование результатов в виде цитограмм.

Статистический анализ данных выполняли с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета «Statistica 6». Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, ошибок средних, а также величины дисперсии, среднего квадратичного отклонения и анализа асимметричности распределения. Различия между сравниваемыми группами рассчитывали по критериям Вилкоксона – Манна – Уитни, Колмагорова – Смирнова или Стьюдента. Уровень значимости устанавливался равным 0,05.

Нейтрофильные гранулоциты традиционно относятся к фагоцитирующим клеткам, которые,

благодаря ряду уникальных свойств (высокой подвижности, способности легко передвигаться в тканях, наличию мощных бактерицидных и цитотоксических продуктов), рассматриваются как своеобразный «отряд быстрого реагирования» в системе неспецифической защиты организма.

Ретроспективный анализ литературы и полученная нами база данных фазово-интерференционных изображений клеток позволили выделить и идентифицировать различные морфологические типы нейтрофилов, характеризующие ту или иную степень их активности. Основой для дискриминации структурно измененных клеток служили различные варианты их формы, характер рельефа поверхности, наличие псевдоподий, гранул, вакуолей и т.п.

Выделено три основных морфологических типа нейтрофилов:

I – клетки округлой формы с четко выраженными границами, неровной бугристой поверхностью, плотной цитоплазмой, центрально расположенным бобовидным несегментированным или (реже) сегментированным ядром;

II – клетки разнообразных форм и размеров с неровной бугристой поверхностью, четкими извилистыми границами, зернистой цитоплазмой, хорошо сформированными и четко очерченными псевдоподиями (2-3 и более), сегментированным ядром, расположенным слегка асимметрично;

III – клетки разнообразных форм и размеров с нечеткими размытыми границами, сильно вакуолизированной, просветленной, рыхлой цитоплазмой с нарушенной структурой и опущенными гранулами, сегментированным, расположенным асимметрично ядром на периферии клетки (рис. 1).

Установлено, что в пуле циркулирующих нейтрофилов соматически здоровых лиц содержание неактивных клеток I типа составляет $19,7 \pm 3,1\%$, число функционально активных зрелых нейтрофилов (II морфологический тип) – $71,2 \pm 4,3\%$, а дегенеративно измененных, исчерпавших свой функциональный резерв (III морфологический тип), – $9,1 \pm 2,8\%$ (рис. 2).

У больных остеомиелитом отмечено изменение морфофункционального состояния НГ, которое сопровождалось появлением клеток с модифицированными цитоморфологическими

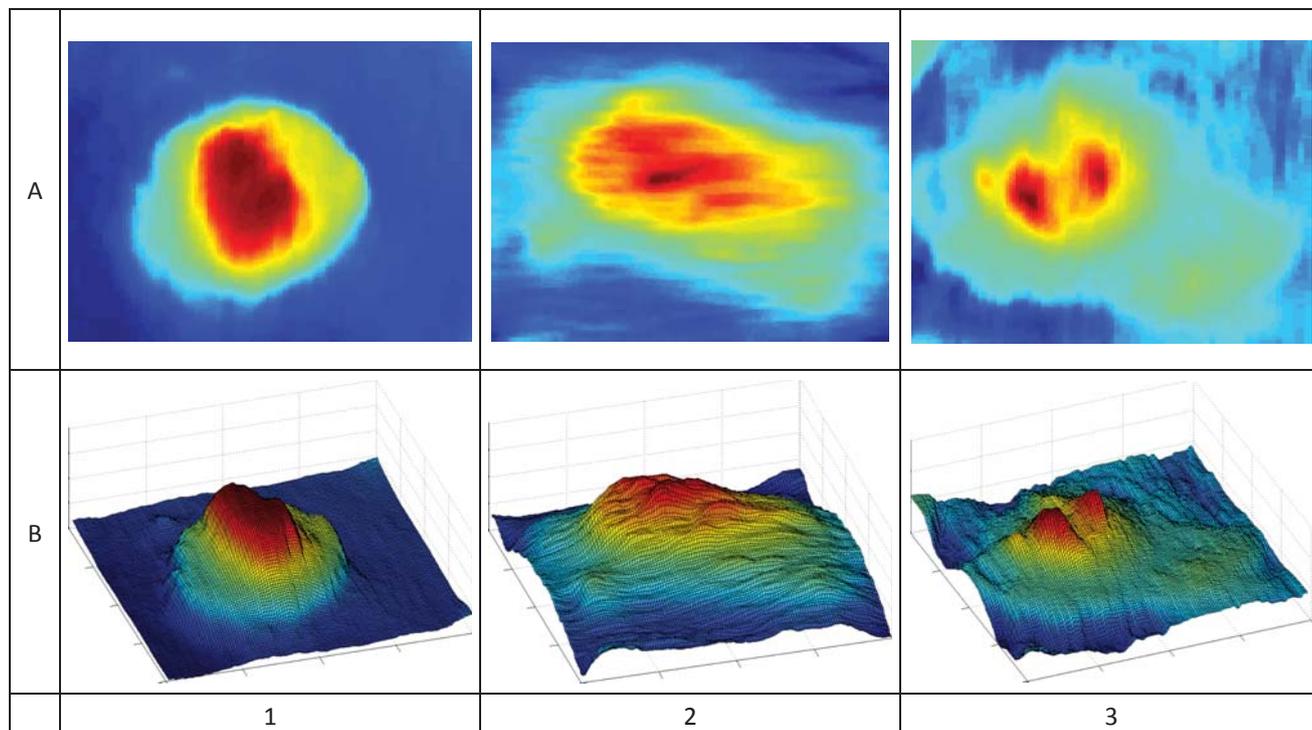


Рис. 1. Различные морфологические типы живых функционирующих нейтрофильных гранулоцитов периферической крови: 1 – I морфологический тип; 2 – II тип; 3 – III тип. А – фазово-интерференционные портреты живых клеток; В – 3D-реконструкция клеточных образов.

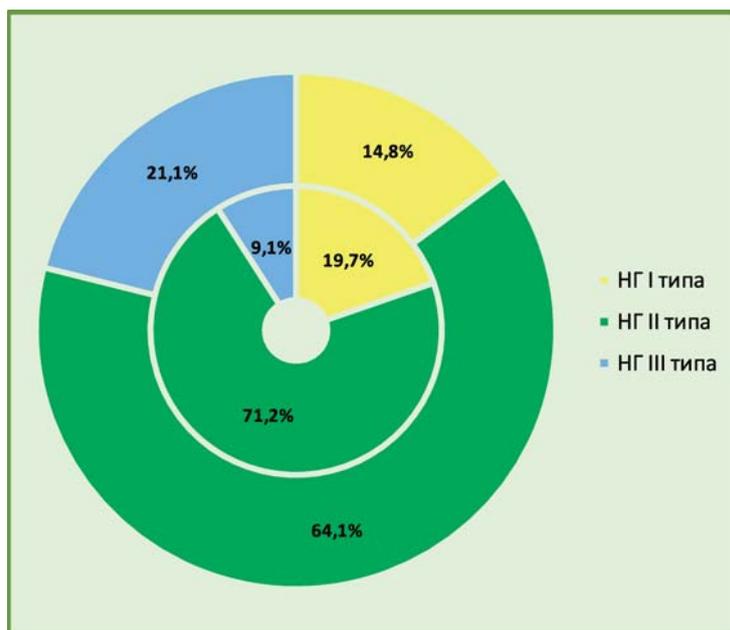


Рис. 2. Соотношение морфологических типов нейтрофильных гранулоцитов периферической крови соматически здоровых лиц (внутренний круг) и больных остеомиелитом (внешний круг), %.

характеристиками: количество функционально полноценных зрелых нейтрофилов по сравнению с донорской группой снизилось до 64,1%, пул неактивных НГ уменьшился до 14,8%, а дегенеративных НГ увеличился до 21,1%.

При анализе фазово-интерференционных изображений следует учитывать, что размерные параметры фазового портрета содержат информацию не только о пространственно-объемных характеристиках клетки, но и о ее оптических

свойствах, в частности, о внутриклеточной анизотропии. Величина показателя преломления, измеряемая в каждой точке цитообъекта, непосредственно зависит от концентрации, химического состава, агрегатного состояния внутриклеточного вещества, наличия или отсутствия органелл и включений. Изменение любого из указанных условий находит отражение в характерных локальных трансформациях фазового изображения клетки.

Установлено, что значения диаметра и периметра НГ крови больных с остеомиелитом достоверно превышали нормативные показатели соответственно на 19 и 21%. Средняя в популяции величина площади клеток увеличивалась практически на 40%. Значения фазовой высоты и объема клеток снижались на 18% ($p < 0,05$) и 13% ($p < 0,05$) соответственно.

Величины диаметра, периметра и площади могут непосредственно отражать все изменения формы клеток, связанные с появлением псевдоподий по мере активации нейтрофила и реализации его основных эффекторных реакций (фагоцитоза, эндоцитоза, киллинга, переваривания, выделения биологически активных продуктов). Величина фазовой высоты зависит от особенностей состояния ядерных структур и гранулярного аппарата клетки. Объем нейтрофилов также характеризует степень активации, дегрануляции и вакуолизации нейтрофилов.

Полученные размерные показатели морфофункционального состояния нейтрофилов больных остеомиелитом свидетельствуют о дисбалансе клеточного состава неспецифического звена иммунитета и позволяют предположить наличие функциональной недостаточности антимикробной защиты организма.

Под влиянием NO-терапии в периферической крови больных остеомиелитом наблюдалось прогрессивное увеличение популяции активных нейтрофилов: 64,1, 70 и 78% от общего количества на 1-, 3- и 7-е сутки соответственно (в норме – 71%). Так же прогрессивно, но в меньшей степени, увеличивался процент интактных НГ в те же сроки: на 14,8, 15,2 и 16% соответственно. Снижалось количество дегенеративных клеток на 21,1, 14,8 и 12% соответственно (рис. 3).

В отношении средних в популяции размерных показателей было выявлено, что к 7-м суткам NO-терапии отмечалась устойчивая тенденция к нормализации размерных параметров клеток: диаметр, периметр, высота, площадь и объем нейтрофилов составляли соответственно 109, 111, 99, 117 и 102% от нормативных значений. Этот факт убедительно свидетельствует о положительном эффекте экзогенного оксида азота на морфофункциональное состояние нейтрофилов. Незначительное превышение показателей по отношению к норме отражает, по-видимому, стимулирующее действие NO.

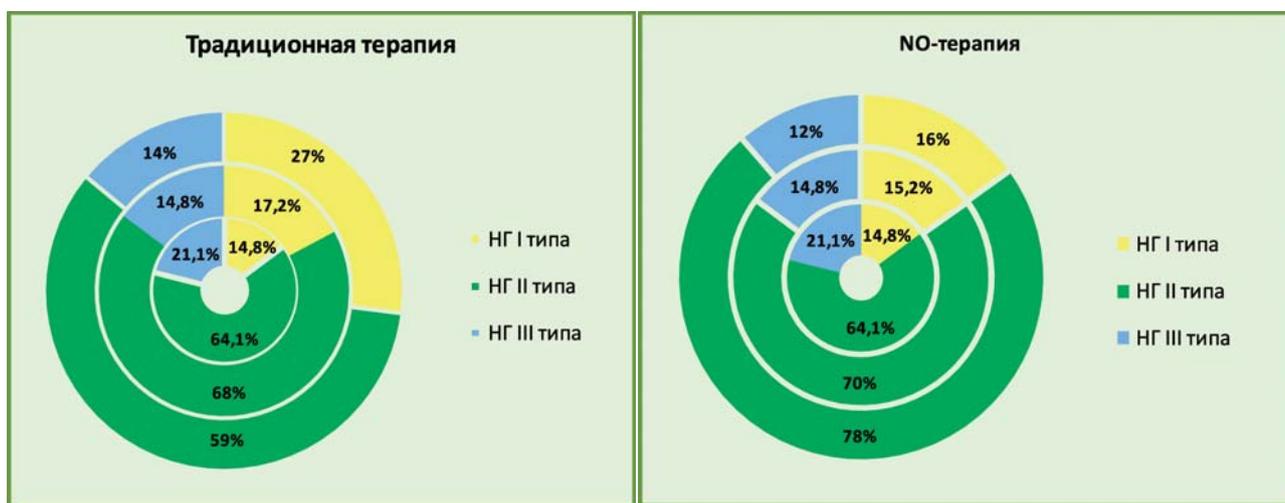


Рис. 3. Соотношение морфологических типов НГ периферической крови больных с остеомиелитом до лечения (внутренний круг), на 3-и сутки (средний круг) и на 7-е сутки терапии (внешний круг) при традиционной и NO-терапии, %.

При проведении традиционной терапии на 7-е сутки содержание функционально зрелых активных нейтрофилов составило всего 59%, дегенеративных – 14%. Значительно возросло число неактивных клеток – до 27% (против 20% в норме). У больных группы сравнения также наблюдалась нормализация клеточных параметров. Однако к 7-м суткам лечения значения морфометрических показателей оказались ниже нормативных: диаметр, периметр, высота площадь и объем нейтрофилов составили соответственно 94, 91, 91, 110 и 93%. Не исключено, что объяснением данного факта служит некоторое подавление функциональной активности НГ в процессе антибиотикотерапии, и, как следствие этого, увеличение процентного содержания ареактивных нейтрофилов I морфологического типа.

Анализ динамики клинических проявлений (прекращение боли, уменьшение отека, закрытие свищевых ходов, хорошая эпителизация, улучшение общего самочувствия больного и т.п.) показал, что в основной группе купирование местных симптомов происходило в более ранние сроки. Отмечены хорошие косметические показатели, включая наличие гладкого нежного рубца в раннем послеоперационном периоде. Было также выявлено достоверное уменьшение сроков пребывания больных в стационаре при использовании НО-терапии: 14,1±2,9 сут против 19,3±3,7 в группе сравнения.

Полученные результаты позволяют заключить, что для больных остеомиелитом характерны нарушения клеточного звена неспецифической резистентности: изменение морфологической структуры и функциональной активности при снижении резервных возможностей фагоцитирующих клеток. Морфометрическими признаками этих изменений являются внутрипопуляционная перестройка нейтрофильных гранулоцитов, достоверное увеличение средних значений диаметра, периметра и площади, уменьшение фазовой высоты и объема клеток.

НО-терапия оказывает стимулирующее влияние на эффекторные клетки неспецифической

резистентности. Она способствует структурно-объемной трансформации нейтрофильных гранулоцитов (нормализации размерных показателей) и изменению состава циркулирующей популяции (увеличение пула функционально активных клеток до 78%).

На фоне нормализации показателей неспецифической резистентности происходит относительно быстрое купирование клинических проявлений, уменьшение количества осложнений, сокращение сроков пребывания в стационаре (на 5,2 койко-дня), достигается хороший косметический эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Василенко И.А., Шабалин В.Н., Тычинский В.П.* и др. Новая технология прижизненной компьютерной фазовой микроскопии: диагностические возможности и перспективы // Радиозлектроника в медицинской диагностике (оценка функций и состояния организма). – М., 1995. – С. 164-169.
2. *Дацко А.А., Тетюхин Д.В.* Реализация современных принципов лечения повреждений челюстно-лицевой области // Стоматология. – 2003. – № 1. – С. 17-22.
3. *Ефименко Н.А., Хрупкин В.И., Марахонич Л.А.* и др. Воздушно-плазменные потоки и НО-терапия – новая технология в клинической практике военных лечебно-профилактических учреждений // Военно-мед. журн. – 2005. – № 5. – С. 51-54.
4. *Кирпичников М.В., Фомичев Е.В., Ярыгина Е.Н., Фомичев Д.Е.* Этиология и клиника атипичнотекущих и хронических воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области // Вестн. Волгоградского мед. ун-та. – 2003. – вып. 9. – С. 187-189.
5. *Шехтер А.Б., Кабисов Р.К., Пекшев А.В.* и др. Экспериментально-клиническое обоснование плазmodинамической терапии ран оксидом азота // Бюлл. экспер. биол. мед. – 1998. – № 8. – С. 210-215.
6. *Ida M., Watanabe H., Tetsumura A., Kurabayashi T.* CT findings as a significant predictive factor for the curability of mandibular osteomyelitis: multivariate analysis // Dentomaxillofac. Radiol. – 2005. – V. 34, No. 2. – P. 86-90.
7. *Scolozzi P., Lombardi T., Edney T., Jaques B.* Enteric bacteria mandibular osteomyelitis // Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol., Endodont. – 2005. – V. 99, No. 6. – P. 42-46.