

УДК 616.31

## ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ОДОНТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

**Настуева А.М., Хараева З.Ф., Мустафаев М.Ш., Гендугова О.М.**

*ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский университет им. Х.М. Бербекова»,  
Нальчик, e-mail: 7070003@mail.ru*

Исследованы основные звенья антибактериальной защиты видового иммунитета у больных с остеомиелитом одонтогенной этиологии. Нейтрофилы больных с одонтогенным очаговым остеомиелитом в острой фазе заболевания продуцировали значительно превосходящие нормальные количества супероксидного анион-радикала. Однако количество фагоцитирующих клеток и эффективность внутриклеточного киллинга нейтрофилами достоверно снижены по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, при поиске причин неэффективности фагоцитарной системы больных выявлено, что доля внутриклеточных активных форм кислорода в нейтрофилах больных достоверно ниже по сравнению со здоровыми донорами. Таким образом, выявлено основное звено нарушенной антибактериальной защиты у пациентов с тяжелыми бактериальными инфекциями, что создает предпосылки для апробации лекарственных препаратов, воздействующих на процессы внутриклеточного радикалообразования.

**Ключевые слова:** одонтогенный остеомиелит, фагоцитарная активность нейтрофилов, свободно-радикальный статус

## THE PHAGOCYTING ACTIVITY OF NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH ACUTE ODONTOGEN OSTEOMYELITIS

**Nastueva A.M., Kharaeva Z.F., Mustafaev M.S., Gendugova O.M.**

*Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov, Nalchik, e-mail: 7070003@mail.ru*

The main links of the antibacterial protection of innate immunity in patients with odontogenic osteomyelitis etiology were studied. The neutrophils of patients with odontogenic osteomyelitis in the acute phase of the disease was produced much higher than normal amounts of superoxide anion-radical. However, the number phagocytosed cells and the efficiency of intracellular killing by neutrophils significantly reduced compared with healthy donors. In addition, when searching for the causes of the ineffectiveness of the phagocytic system patients revealed that the proportion of intracellular reactive oxygen species in neutrophils of patients was significantly lower compared with healthy donors. Thus, the identified main link broken antibacterial protection in patients with severe bacterial infections, which creates conditions for testing drugs that affect the processes of intracellular radical production.

**Keywords:** odontogen osteomyelitis, phagocytting activity of neutrophils, free – radical state

Острый одонтогенный остеомиелит – гнойно-инфекционное воспалительное заболевание челюстных костей, при котором источником инфекции являются пораженные кариесом и его осложнениями зубы. Остеомиелит челюстно-лицевой области характеризуется тяжелым клиническим течением, длительностью и сложностью лечения, высоким процентом осложнений, зачастую приводящих к формированию значительных функциональных и эстетических нарушений. Отмечается тенденция к росту случаев затяжного течения заболевания [1, 2, 3]. Однако современные аспекты патогенеза и лечения острого одонтогенного остеомиелита челюстно-лицевой области мало освещены. Течение гнойной инфекции определяется не только характером инфекционного начала, но и резервными возможностями иммунной системы.

Одонтогенный остеомиелит вызывается бактериальной флорой, присутствующей в очагах одонтогенного воспаления. Наиболее часто обнаруживаются стрептококки, золотистый стафилококк, ассоциации

фузобактерий, бактероидов, пептострептококков. Микробный состав характеризуется множественной антибактериальной резистентностью. Необходимо также отметить, что неадекватное применение антибактериальных препаратов на догоспитальном этапе приводит к нарушениям иммунологической реактивности организма [2, 3].

В последние годы появились новые данные об участии цитокин- и радикал-опосредованных механизмов формирования иммунной недостаточности при хирургической инфекции [3, 4, 5, 6, 7]. Признано, что типы иммунного ответа связаны с одним из вариантов активации лимфоцитов с преимущественным участием Т-лимфоцитов хелперов типа 1 (Th<sub>1</sub>) или 2 (Th<sub>2</sub>). Активация Th<sub>1</sub>, секретирующих интерлейкин-2 (ИЛ-2) и интерферон гамма (ИФНγ), стимулирует развитие клеточного типа ответа, в то время как синтез Th<sub>2</sub> ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13 стимулирует гуморальный ответ. В первую фазу ранозаживления наиболее значима роль провоспалительных иммуоцитокинов – ИЛ-1, 6, 8; фактор некроза опухоли

$\alpha$  (ФНО $\alpha$ ); ИФН $\gamma$ , регулирующих эффекторные функции нейтрофилов, в частности их фагоцитарную активность [6]. Однако повышенные концентрации провоспалительных иммуноцитокинов, выявленные и описанные в литературе при гнойно-воспалительных заболеваниях, не всегда коррелируют с быстрой и полной элиминацией инфекционного агента [6].

Длительное существование хронического очага инфекции, являющегося «причинным» при развитии остеомиелита одонтогенной этиологии, свидетельствует о иммуносупрессивном состоянии макроорганизма. Это приводит к изменению типичной клинической картины заболевания за счет снижения иммунологического статуса, неадекватной реакции на комплексное медикаментозное и другие виды лечения.

**Цель исследования:** изучить активность эффекторных функций нейтрофилов пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом.

#### Материалы и методы исследования

Обследовано 32 пациента с острым очаговым остеомиелитом нижней челюсти (14 женщин, 18 мужчин в возрасте от 26 до 47 лет), госпитализированных в отделение челюстно-лицевой хирургии республиканской клинической больницы города Нальчика. Пациентам экстренно проводилось хирургическое вмешательство, состоящее в удалении причинного зуба, проведении двусторонних разрезов в полости рта; антибактериальной терапии, включающей назначение антибиотиков тропных к костной ткани (линкомицин, тетрациклин, фузидин) и широкого спектра действия (цефалоспорины). Уменьшение общей интоксикации, улучшение реологических свойств крови достигались посредством применения антикоагулянтов прямого действия (гепарин), парентерального введения реополиглобулина, глюкозы, солевых растворов. Проводилась десенсибилизирующая и физиотерапия. Контрольную группу составили 35 здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет.

Продукцию супероксидрадикала нейтрофилами периферической крови больных и здоровых доноров определяли по реакции восстановления цитохрома с [3]. Внутриклеточную генерацию радикалов исследовали с помощью флуоресцентного красителя гидроэтидина [3]. Нейтрофилы инкубировали в растворе Хенкса (без фенолового красного, рН 7,4), 15 минут с  $10^{-4}$  М гидроэтидина, отмывали центрифугированием (5 минут при 800 g и + 4 °С) в избытке раствора Хенкса и окончательно ресуспендировали до концентрации  $10^6$  кл/мл. После этого клетки стимулировали форболмиристатацетатом (ФМА)  $10^{-5}$  М. Образование этидиума из гидроэтидина в клетках регистрировали, измеряя интенсивность флуоресценции этидиума при длинах волн  $\lambda_{\text{возб}} = 473$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 610$  нм на спектрофлуориметре MPF-44 (Perkin-Elmer) в сантиметровых кварцевых кюветках, термостатированных при 37 °С и при постоянном перемешивании.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*. Для этого смешивали 1 мл клеточной суспензии ней-

трофилов в концентрации  $10^7$  клеток/мл и 1 мл взвеси бактерий ( $10^7$ ) в растворе Хенкса. Смесь инкубировали при помешивании 30 минут при 37 °С. Готовили мазки на стекле, фиксировали, окрашивали по Романовскому – Гимзе и подсчитывали число фагоцитированных клеток. Полученные данные выражали в виде % фагоцитирующих клеток.

Оценка эффективности внутриклеточного киллинга проводилась по методу Nilsen S. [8]. После 30-минутной инкубации нейтрофилов со стафилококками (условия указаны выше) непоглощенные бактерии отмывались центрифугированием 1500 об/мин 10 минут. Число поглощенных, но живых стафилококков определяли по высеву лизата нейтрофилов по методу Гольда на чашки Петри с мясо-пептонным агаром. Лизис нейтрофилов проводили путем добавления трехкратного объема воды.

Результаты подвергались статистической обработке путем определения среднего арифметического и среднеквадратичного отклонений. Существенность различий средних величин оценивали по критерию Стьюдента.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Механизмы антимикробной активности фагоцитов в основном сходны и опосредуются двумя путями. Первый – кислороднезависимый механизм – обусловлен действием на бактериальную клетку лизосомальных ферментов: лизоцима, катионных белков, лактоферрина и других активных веществ. Основой другого механизма является способность фагоцитов к респираторному взрыву. В последние годы особое внимание уделяется роли окислительного стресса в патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний, универсальность которого позволяет предположить участие активных форм кислорода в противомикробной защите и инициации воспаления [3]. Увеличение оксидантного статуса должно привести к повышению бактерицидных свойств фагоцитирующих клеток.

Нейтрофилы больных с одонтогенным очаговым остеомиелитом в острой фазе заболевания продуцировали значительно превосходящие нормальные количества супероксидного анион-радикала (таблица). Продукция активных форм кислорода является одним из важнейших противомикробных механизмов защиты организма, повышение продукции супероксидрадикала нейтрофилами больных должно было привести к быстрому и полному уничтожению поглощенных лейкоцитами стафилококков. Однако количество фагоцитирующих клеток и эффективность внутриклеточного киллинга нейтрофилами оказались достоверно снижены в обеих группах больных по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,05$ ) (таблица).

Функциональная активность нейтрофилов больных с острым одонтогенным остеомиелитом, ( $\bar{x} \pm m$ )

Нейтрофилы	Показатели функциональной активности нейтрофилов			
	Восстановление цитохрома с, нМ/мин	Доля внутриклеточных радикалов (% от суммарной)	Процент фагоцитировавших клеток	Процент выживших бактерий после фагоцитоза
Больных с одонтогенным остеомиелитом	6,2 ± 0,5 <sup>1</sup>	15,0 ± 2,0 <sup>1</sup>	29,5 ± 2,0 <sup>1</sup>	15,5 ± 1,5 <sup>1</sup>
Здоровых доноров	1,3 ± 0,5	35,0 ± 3,5	38,0 ± 1,5	5,0 ± 0,6

Примечание. <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  по сравнению с показателями доноров.

При поиске причин неэффективности фагоцитарной системы больных был использован метод регистрации внутриклеточной продукции радикалов [3], позволяющий количественно оценить внеклеточную и внутриклеточную генерацию активных форм кислорода. Выявлено, что доля внутриклеточных активных форм кислорода значительно снижена в нейтрофилах обеих групп инфекционных больных по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,05$ ) (таблица).

Из полученных данных мы заключили, что в активной фазе стафилококкового воспаления происходит мощный внеклеточный выброс свободных радикалов, которые могут инактивировать микроорганизмы во внеклеточном пространстве. При этом смещается равновесие вне/внутриклеточной продукции в сторону внеклеточного процесса. В результате формируется внутриклеточный дефицит свободных радикалов и страдает завершенность фагоцитоза создаются условия для длительной персистенции микробов в организме.

**Заключение**

Свободно-радикальный статус пациентов с острым одонтогенным очаговым остеомиелитом челюстей характеризуется выраженным дефицитом внутриклеточных радикалов, что приводит к неэффективному внутриклеточному киллингу патогенов. Таким образом, создаются условия для длительного течения заболевания и его перехода в хроническую форму.

**Список литературы**

1. Агапов В.С., Шулаков В.В., Фомченков Н.А. Комплексное лечение хронического травматического остеомиелита нижней челюсти с использованием медицинского озона // Актуальные проблемы современной стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. – 2001. – № 1. – С. 4–7.
2. Бернадский Ю.И. Основы челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии. – М. – 2000. – 404с.
3. Бизюкин А.В., Хараева З.Ф. Эффекты ионов кальция на вне- и внутриклеточные процессы генерации активных форм кислорода в фагоцитарных клетках крови // Бюлл.экспер.биол.мед. – 1998. – Т.126, № 9. – С. 334–337
4. Земсков А.М., Коротких Н.Г., Нектаревская И.Б. Особности иммунных расстройств и эффективность их коррек-

ции у больных с хроническим травматическим остеомиелитом нижней челюсти // Стоматология. – 2001. – № 6. – С. 31–34.

5. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс (биохимический и патофизиологический аспекты). – М. – 2001. – 112 с.

6. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета // Иммунология. – 1995. – № 3. – С. 30–36.

7. Хасанов А.И., Абдуллаев Ш.Ю. Значение уровня продуктов перекисного окисления липидов для прогнозирования травматического остеомиелита нижней челюсти // Стоматология. – 2002. – № 2. – С. 27–29.

8. Nielsen S.L., Black F., Storgaard M., Obel N. Evaluation of a method for measurement of intracellular killing of Staphylococcus aureus in human neutrophil granulocytes // J. Biochem. – 1995. – Vol. 118(2). – P. 271–277.

**References**

1. Agapov V.S., Shulakov V.V., Phomchenkov N.A. Complex treatment of chronic traumatic osteomyelitis of mandibula with medical ozon. Aktualnyue problem sovremennoy stomatologii y chelustno-licevoy khirurgii. 2001. no. 1. pp. 4–7.
2. Bernadsky Y.I. Fundamentals of maxillofacial surgery and surgical dentistry. M. 2000. 404 p.
3. Byzukin A.V., Kharaeva Z.F. Effects-f calcium on the extra- and intracellular processes of production of reactive oxygen species in phagocytting cells. Bull.exp.med.biol. 1998. T. 126, no. 9. pp. 334–337.
4. Zemskov A.M., Korotkikh N.G., Necarevskaya I.B. Features of immune disorders and the effectiveness of their correction in patients with chronic traumatic osteomyelitis of the mandible .Stomatology. 2001. no. 6. pp. 31–34.
5. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshikova E.B. Oxidative stress (biochemical and pathophysiological aspects). M., 2001. 112 p.
6. Ketlinskiy S.A., Kalinina N.M. Cytokines in mononuclear phagocytes in the regulation of the reaction of inflammation and immunity. Immunology. 1995. no. 3. pp. 30–36.
7. Khasanov A.I., Abdulaev Sh.Y. The level of peroxide oxidation of lipids to predict traumatic osteomyelitis of the mandible. Stomatology. 2002. no. 2. pp. 27–29.
8. Nielsen S.L., Black F., Storgaard M., Obel N. Evaluation of a method for measurement of intracellular killing of Staphylococcus aureus in human neutrophil granulocytes // J.Biochem. 1995. Vol. 118(2). pp. 271–277.

**Рецензенты:**

Иванова М.Р., д.м.н., главный врач Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Нальчик;

Борукаева И.Х., д.м.н., профессор кафедры нормальной и патологической физиологии, ФГОУ ВПО КБГУ им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик.

Работа поступила в редакцию 05.12.2014.