

dr n. med. Grzegorz Szczęsny

Rozprawa habilitacyjna

pt.

**„Udział układu chłonnego kończyny
dolnej w procesie gojenia zmian
pourazowych”**

z

Zespołu Kliniczno – Badawczego Chirurgii Transplantacyjnej

Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. M. Mossakowskiego

Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 2010

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Panu prof. dr hab. n. med. Waldemarowi L. Olszewskiemu za opiekę naukową, cenne uwagi, wnikliwą dyskusję, pomoc i życzliwość okazane w mojej pracy naukowej oraz w przygotowaniu niniejszej Pracy,

Panu prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Góreckiemu za okazaną mi pomoc i wsparcie w realizacji pracy naukowej,

Koleżankom i Kolegom z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, oraz Kliniki Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za pomoc w realizacji badań stanowiących treść niniejszej pracy,

Grzegorz Marek Szczęsny

Spis treści:

Podziękowania	2
Hipoteza badawcza.....	5
Cel pracy.....	6
Lista cytowanych prac własnych:	6
Badania własne	7
Zagadnienie 1.....	7
Zagadnienie 2.....	7
Zagadnienie 3.....	7
Praca I.....	8
Praca II.....	9
Praca III.....	10
Praca IV.....	11
Praca V.....	12
Praca VI.....	13
Praca VII.....	14
Podsumowanie	15
Wnioski	17
Aspekty praktyczne wynikające z pracy.....	17
Piśmiennictwo	18

Wstęp

Zaburzenia zrostu kostnego są częstym powikłaniem złamań kości długich. Ocenia się, że występują one aż w 5-10% złamań [1,2]. Ich leczenie jest niezwykle trudne i często, pomimo stosowania długotrwałego unieruchomienia i wykonywania zabiegów operacyjnych, nie prowadzi do wygojenia złamania. W zależności od nasilenia zmian patologicznych dochodzi do spowolnienia postępu zrostu kostnego, a w skrajnych przypadkach do jego całkowitego zahamowania z powstaniem stawu rzekomego. Ocenia się, że urazom ulega corocznie około 2,5 - 3 % populacji, czyli w Polsce rocznie około 1 - 1,2 miliona osób [3].

Przyczyną zaburzeń gojenia złamania mogą być rozległa traumatyzacja tkanek będących źródłem komórek prekursorowych [4,5], zaburzenia krążenia [6,7], schorzenia metaboliczne, zakaźne i nowotworowe [8], oraz ich leczenie (chemo i radioterapia, antybiotykoterapia, sterydoterapia) [9,10]. Uszkodzenie komórek pnia, będących prekursorami komórek linii mezenchymalnej, w tym osteoblastów, lub ich niedostateczna stymulacja molekularna mogą zaburzać lub uniemożliwić konsolidację złamania [11,12].

Kontaminacja tkanek głębokich florą skórą lub środowiskową w przypadku złamań otwartych i ich kolonizacja w urazach zamkniętych, szczególnie przy upośledzeniu mechanizmów odpornościowych, może prowadzić do rozwoju bakteryjnego procesu zapalnego i w konsekwencji stawu rzekomego zakażonego [13]. O ile w przypadku urazów otwartych dochodzi do translokacji patogenów poprzez uszkodzoną skórę, to źródłem zakażenia w urazach zamkniętych mogą być szczepy napływające do miejsc urazu drogą chłonną z obwodu kończyny (stopy), krocza lub z ognisk odległych drogą krwionośną [14].

Rozległe, mechaniczne zniszczenie tkanek powoduje napływ mikro i makrofagów oraz komórek dendrytycznych i transport własnych antygenów drogą limfatyczną do regionalnych węzłów chłonnych. Tak więc, w każdym przypadku urazu, wskutek uszkodzenia molekularnej struktury komórek gospodarza i wniknięcia obcych antygenów (mikroorganizmów), dochodzi do aktywacji układu odpornościowego (chłonnego) przez receptory PRR (pattern recognition receptors), do których należą m.in. receptory typu Toll (toll-like receptors - TLR), które rozpoznają PAMP (pathogen - associated molecular patterns) [15] lub DAMP (damage - associated molecular pattern) [16]. Na obecnym etapie poznania wydaje się, że zarówno sam mechanizm aktywacji, jak i wywołanej nią odpowiedzi układu chłonnego, jest w obu przypadkach analogiczny i, w przypadku odpowiedzi aktywowanej przez DAMP, przebiega tak samo niezależnie od tego, czy uszkodzenie dotyczy tkanek miękkich, czy kości. Każdy proces patologiczny, aktywowany uszkodzeniem własnych tkanek lub działaniem patogenów, powinien zatem znajdować swe odzwierciedlenie w węźle chłonnym drenującym miejsce uszkodzenia.

Moje wcześniejsze badania doświadczalne oraz obserwacje przeprowadzone w grupie chorych z przewlekłymi obrzękami pourazowymi kończyn dolnych wykazały aktywację miejscowej reakcji zapalnej przez uraz. W opracowanym laboratoryjnym modelu badawczym z użyciem przyżyciowego mikroskopu fluorescencyjnego [17] obserwowałem zwiększone wynaczynienie znacznika reprezentujące powstawanie obrzęku i zwiększoną liczbę toczących się i przylegających do ściany pozawłośniczkowych naczyń żylnych, obrazujące wynaczynienie do tkanek leukocytów. Jednocześnie nie było cech zastoju chłonnego czy uszkodzenia ścian naczyń z wynaczynieniem kontrastu, a odpływ chłonny był nawet przyspieszony [18].

Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych były zbieżne z obserwacjami klinicznymi. Zwiększone przesączanie płynu do przestrzeni pozanaczyniowej i jego kumulacja w tkance, związane z miejscowym procesem zapalnym wywołanym przez uraz mechaniczny, prowadziło do powiększenia drenujących miejsce urazu węzłów chłonnych widocznych w badaniach limfocyntygraficznych [19]. Obserwacje te wskazywały na aktywację węzłów chłonnych drenujących miejsce urazu, sugerując możliwy udział układu odpornościowego w procesie gojenia.

Hipoteza badawcza

Rutynowo opisane obserwacje dotyczące przyczyn braku gojenia rany kostnej po złamaniu obejmują procesy zachodzące w samej ranie. Powoduje to koncentrację uwagi terapeuty na leczeniu miejscowym. Przynosi to pewne efekty, ale w niektórych przypadkach jest mało skuteczne. Powstaje więc pytanie, czy zaburzenia gojenia nie mają swojej przyczyny w układzie regulacyjnym, jakim jest układ chłonny drenujący ranę. Wiadomo dziś, iż każdy proces tkankowy związany z wniknięciem obcych antygenów, takich jak drobnoustroje, bądź uwolnieniem własnych antygenów komórkowych, czy przebudową tkanki znajdują swoje odzwierciedlenie w tym układzie. Wydaje się więc celowe zbadanie, czy mechanizm gojenia nie jest regulowany w regionalnych węzłach chłonnych. W węzłach ma miejsce eliminacja antygenów i tworzenie specyficznych antygenowo klonów cytotoksycznych i regulacyjnych wysyłanych do krążenia i miejsca urazu, a także powstawanie komórek pamięci. Mechanizm ten służy gojeniu się rany, ale może też w przypadku zaburzeń regulacji prowadzić do rozwoju autoagresji w ranie i w efekcie do przedłużonego gojenia.

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie:

1. Czy w węzłach chłonnych kończyn dolnych drenujących miejsce zamkniętego urazu mechanicznego tkanek miękkich i złamania kości rozwija się reakcja odpornościowa?
2. Czy odpowiedź węzła chłonnego na zamknięty uraz tkanek miękkich i złamań kości może być spowodowana przez uwalnianie z tkanek antygeny własne i bakterie zasiedlające tkanki?
3. Czy istnieje predyspozycja genetyczna do wzmożonej odpowiedzi na zakażenia w niegojących się złamaniach kości u nosicieli mutacji genu dla TLR4?

Lista cytowanych prac własnych:

- I. Szczęsny G, Olszewski WL: The pathomechanism of posttraumatic edema of lower limbs: I. The effect of extravasated blood, bone marrow cells, and bacterial colonization on tissues, lymphatics, and lymph nodes. *J Trauma*. 2002;52(2):315-22.
IF=1,617
- II. Szczęsny G, Olszewski WL: The pathomechanism of posttraumatic edema of the lower limbs: II - Changes in the lymphatic system. *J Trauma*. 2003;55(2):350-4.
IF=1,429
- III. Szczęsny G, Olszewski WL, Zaleska M: Limb Lymph Node Response to Bone Fracture. *Lymph. Res. Biol.* 2004;2(4):155-164.
Nowe czołowe czasopismo w dziedzinie limfologii wydawane w USA, nie ma jeszcze IF
- IV. Szczęsny G, Olszewski WL, Górecki A: Lymphoscintigraphic monitoring of the lower limb lymphatic system response to bone fracture and healing. *Lymphat Res Biol.* 2005;3(3):137-45.
Nowe czołowe czasopismo w dziedzinie limfologii wydawane w USA, nie ma jeszcze IF
- V. Szczęsny G, Olszewski WL, Gewartowska M, Zaleska M, Górecki A.: The healing of tibial fracture and response of the local lymphatic system. *J Trauma*. 2007;63(4):849-54.
IF=2,334
- VI. Szczęsny G, Interewicz B, Swoboda-Kopec E, Olszewski WL, Górecki A, Wasilewski P.: Bacteriology of callus of closed fractures of tibia and femur. *J Trauma*. 2008;65(4):837-42.
IF=2,342
- VII. Szczęsny G, Olszewski WL, Swoboda-Kopec E, Zagozda M, Czapnik Ż, Interewicz B, Stachyra E, Maziarz M, Górecki A: Genetyczna predyspozycja do zaburzeń zrostu kostnego - wpływ punktowej mutacji Asp299Gly TLR4 na bakteriozależne zaburzenia gojenia. *Chir Narz Ruchu i Ortop Pol.* 2010;75(1):57-63.
IF=0

Badania własne

Zagadnienie 1.

Czy w węzłach chłonnych kończyn dolnych drenujących miejsce zamkniętego urazu mechanicznego tkanek miękkich i złamania kości rozwija się reakcja odpornościowa?

- I. Szczęsny G, Olszewski WL: The pathomechanism of posttraumatic edema of lower limbs: I. The effect of extravasated blood, bone marrow cells, and bacterial colonization on tissues, lymphatics, and lymph nodes. *J Trauma*. 2002;52(2):315-22.
- II. Szczęsny G, Olszewski WL: The pathomechanism of posttraumatic edema of the lower limbs: II - Changes in the lymphatic system. *J Trauma*. 2003;55(2):350-4.
- III. Szczęsny G, Olszewski WL, Zaleska M: Limb Lymph Node Response to Bone Fracture. *Lymph. Res. Biol*. 2004;2(4):155-164.
- IV. Szczęsny G, Olszewski WL, Górecki A: Lymphoscintigraphic monitoring of the lower limb lymphatic system response to bone fracture and healing. *Lymphat Res Biol*. 2005;3(3):137-45.
- V. Szczęsny G, Olszewski WL, Gewartowska M, Zaleska M, Górecki A.: The healing of tibial fracture and response of the local lymphatic system. *J Trauma*. 2007;63(4):849-54.

Zagadnienie 2.

Czy odpowiedź węzła chłonnego na zamknięty uraz tkanek miękkich i złamań kości może być spowodowana przez uwalnianie z tkanek antygeny własne i bakterie zasiedlające tkanki?

- VI. Szczęsny G, Interewicz B, Swoboda-Kopeć E, Olszewski WL, Górecki A, Wasilewski P.: Bacteriology of callus of closed fractures of tibia and femur. *J Trauma*. 2008;65(4):837-42.

Zagadnienie 3.

Czy istnieje predyspozycja genetyczna do wzmożonej odpowiedzi na zakażenia w niegojących się złamaniach kości u nosicieli mutacji genu dla TLR4?

- VII. Szczęsny G, Olszewski WL, Swoboda-Kopeć E, Zagozda M, Czapnik Ż, Interewicz B, Stachyra E, Maziarz M, Górecki A: Genetyczna predyspozycja do zaburzeń zrostu kostnego - wpływ punktowej mutacji Asp299Gly TLR4 na bakteriozależne zaburzenia gojenia. *Chir Narz Ruchu i Ortop Pol*. 2010;75(1):57-63.

Praca I.

Celem pracy było zbadanie, jakie zmiany w miejscu wstrzyknięcia oraz w przedwężłowych naczyniach i węzłach chłonnych wywołują: 1) autologiczna krew żylna wstrzyknięta podskórną i bezpośrednio do naczynia chłonnego, 2) autologiczne komórki szpiku kostnego wstrzyknięte podskórną, 3) komórki bakterii szczepów zasiedlających skórę wstrzyknięte podskórną.

Doświadczenia przeprowadzono na psach. Zaobserwowałem drenaż drogą chłonną podskórną wstrzykniętych erytrocytów i leukocytów, wynoszący odpowiednio $0,78 \pm 0,91\%$ i $1,59 \pm 2,03\%$ wstrzykniętych komórek w trakcie pierwszych sześciu godzin obserwacji. Największą dynamikę drenażu wstrzykniętych podskórną erytrocytów i leukocytów występowała w 5-7 godzinie po wstrzyknięciu. Obecności w chłonce wstrzykniętych podskórną płytek krwi nie stwierdziłem. W wykonanych w 7 dobie po wstrzyknięciach w badaniach limfograficznych wykazałem, że zarówno wstrzyknięcie podskórną jak i bezpośrednio do przedwężłowego naczynia chłonnego krwi żylną nie powoduje zaburzeń odpływu chłonnego.

Wstrzyknięcie autologicznej krwi żylną wywoływało niewielkie nacieki komórkowe w miejscu wstrzyknięcia oraz obecność złogów hemosyderyny i elementów subkomórkowych erytrocytów w makrofagach regionalnych węzłów chłonnych. Struktura węzłów chłonnych pozostała niezmienną.

W miejscu wstrzyknięcia szpiku kostnego obserwowałem aktywację miejscowego stanu zapalnego, charakteryzującego się naciekami komórek Mac3+ (makrofagi), DR+ (komórki z antygenem klasy II) i w mniejszym stopniu limfocytów CD3+. Obrazy mikroskopowe węzłów chłonnych drenujących miejsca wstrzyknięcia szpiku wykazały poszerzenie obszarów przykorowych i centrów namnażania z obecnością komórek z figurami podziału mitotycznego oraz zwiększenie liczby komórek Mac3+ (makrofagi) i DR+ (klasa II – makrofagi, aktywowane limfocyty T i B) w obszarach podtorebkowych i przykorowych.

Mieszane hodowle pokazały aktywację limfocytów węzłów chłonnych drenujących miejsca wstrzyknięcia przez autologiczne leukocyty krwi obwodowej i komórki autologicznego szpiku kostnego z indeksami aktywacji odpowiednio $5,5 \pm 9,5$ i $5,95 \pm 6,0$ ($p < 0,05$).

W miejscach powtarzanych podskórnych wstrzyknięć bakterii szczepów *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus simulans* i *Micrococcus spp.* obserwowałem śladowe nacieki komórek zapalnych z cechami kumulacji płynu w przestrzeni pozanaczyniowej (tworzenie obrzęku). W preparatach histologicznych węzłów chłonnych obserwowałem deplecję przestrzeni przykorowych i centrów namnażania oraz pogrubienie torebki węzła z tworzeniem tkanki

włóknistej w rdzeniu. W hodowlach mieszanych limfocyty węzłów wykazywały zwiększoną odpowiedź na mitogeny (PHA, ConA i PWM) oraz na antygeny wstrzykiwanych uprzednio, atenuowanych bakterii.

Obrazy uzyskane w limfografii bezpośredniej wykonane po serii wstrzyknięć bakterii pokazały zachowany odpływ chłonny z poszerzeniem przedwęzłowych naczyń i powiększeniem regionalnych węzłów chłonnych.

Wnioski:

Przeprowadzone badania pokazały drenaż z tkanki drogą chłonną wynaczynionych erytrocytów i leukocytów (ale nie płytek krwi), aktywację miejscowego procesu zapalnego z naciekami komórek zapalnych przez wstrzyknięte komórki autologicznego szpiku i w mniejszym stopniu krwi żyłnej i komórek bakterii szczepów zasiedlających skórę, oraz aktywację limfocytów węzłów chłonnych przez leukocyty krwi żyłnej, komórki szpiku i antygeny uprzednio wstrzykiwanych bakterii. Obserwacje te wskazują na udział węzła chłonnego drenującego miejsce urazu w procesach gojenia zarówno urazów zamkniętych (jałowych), jak i otwartych (z udziałem patogenów). Czynnikiem biorącym udział w aktywacji limfocytów węzłów chłonnych mogą być zarówno antygeny własne, uwalniane z komórek krwiaka pourazowego czy szpiku, jak i bakterie zasiedlające tkanki w przypadku urazów otwartych.

Praca II.

Celem pracy było zbadanie odpowiedzi układu chłonnego kończyn dolnych po urazach mechanicznych prowadzących do powstania przewlekłych obrzęków pourazowych.

W grupie chorych z przewlekłymi obrzękami pourazowymi kończyn dolnych zaobserwowałem zwiększenie temperatury skóry w obrębie kończyny oraz obniżone wartości indeksów tonometrycznych jej tkanek miękkich, wskazujące na obecność miejscowego procesu zapalnego i kumulację płynu formującego obrzęk.

Obrazy limfoscintygraficzne pokazały przyspieszony odpływ chłonki wraz z poszerzeniem przedwęzłowych naczyń chłonnych sugerując względną niewydolność układu chłonnego, spowodowaną nadmiernym przesączaniem płynu do przestrzeni pozanacyniowej. Interesującą obserwacją było powiększenie węzłów chłonnych drenujących miejsce urazu, występujące u 62% chorych. Występowanie w miejscu gojącego się urazu procesu zapalnego, charakteryzującego się zwiększonym uciepleniem, wzmożonym przesączaniem, przyspieszeniem drenażu chłonnego i powiększeniem węzłów chłonnych drenujących miejsce urazu sugeruje, że zmiany w węzłach wywołane są czynnikami drenowanymi z gojącego się tkanek.

Ponieważ cechy zakrzepicy występowały jedynie u 24% chorych, w patomechanizmie przewlekłych obrzęków pourazowych zaburzenia odpływu żylnego zdają się odgrywać drugorzędne znaczenie.

Wnioski

Obserwowane poszerzenie przedwęzłowych naczyń chłonnych i powiększenie regionalnych węzłów chłonnych po urazach zamkniętych sugerują odpowiedź immunologiczną na własne antygeny i cytokiny uwalniane z mechanicznie uszkodzonych tkanek, zarówno miękkich jak i kostnej. Występowanie obserwowanych zmian tygodnie, a nawet miesiące po urazie wskazuje na stałą stymulację regionalnego węzła chłonnego w trakcie trwania procesu gojenia.

Praca III.

O ile zwiększenie odpływu chłonnego z gojących się tkanek znajdowało swe uzasadnienie w toczącym się miejscowym procesie zapalnym, to mechanizm powiększania węzła chłonnego drenującego gojące się tkanki pozostawał niejasny. Niejasne było zwłaszcza to, czy przyczyną jest zwiększenie objętości węzła wynikające z kumulacji drenowanych drogą chłonną *debris* uszkodzonych komórek i tkanek, zwiększenie liczby komórek węzła, czy też zwiększenie objętości elementów pozakomórkowych. Niewiadome było również, czy dochodzi do zmiany odsetka poszczególnych populacji komórkowych węzła chłonnego.

W celu udzielenia odpowiedzi na te pytania dokonałem analizy w cytometrze przepływowym populacji komórkowych zasiedlających węzły chłonne drenujące miejsce urazu wywołanego w warunkach doświadczalnych u szczura przy zastosowaniu różnych modeli urazu: złamanie zamknięte, wynacznienie krwi żylniej (model krwiaka pourazowego), wynacznienie szpiku (model złamania), oraz stłuczenie mięśni łydki i stłuczenie całego przekroju kończyny.

Przeprowadzone badania wykazały zwiększenie masy węzłów chłonnych oraz korelujące z nim zwiększenie liczby komórek, ze zmniejszeniem w cytometrze przepływowym odsetka komórek ED1 (makrofagi) i OX8+ (aktywowane komórki cytotoksyczne). W preparatach histologicznych węzłów obserwowałem zwiększoną liczbę migrujących komórek dendrytycznych (OX62+), limfocytów T (W3/13+ i W3/25+), oraz B (OX12+) i granulocytów (His48+). Stwierdziłem również zwiększoną ekspresję NOS3 i TGF-beta w limfocytach i komórkach śródbłonkowych naczyń krwionośnych węzłów chłonnych.

Hodowle komórkowe limfocytów pokazały znamienne zwiększoną autotransformację i reaktywność na mitogeny limfocytów węzłów chłonnych po wszystkich typach urazu. Największe wartości reaktywności limfocytów obserwowałem po złamaniu podudzia oraz po podskórnych wstrzyknięciach szpiku i krwi żylniej.

Wnioski

Uzyskane wyniki pokazały, że za powiększenie węzłów chłonnych drenujących mechanicznie uszkodzone tkanki odpowiedzialne jest zwiększenie liczby jego komórek. Dochodzi do zwiększenia odsetka komórek OX6+ (klasa II+), OX62+ (migrujące komórki dendrytyczne), OX7+ (komórki pnia), OX12 (limfocyty B) i His 48 (granulocyty), oraz do pobudzenia limfocytów w węzłach drenujących miejsce urazu.

Praca IV.

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie, czy uwolnienie własnych antygenów tkankowych w zamkniętym urazie mechanicznym kończyny dolnej jest zdolne do aktywacji regionalnego węzła chłonnego bez udziału obcych antygenów, oraz jakie są różnice w tej aktywacji w prawidłowo postępującym i zaburzonym procesie gojenia złamania.

Obserwacje przeprowadziłem w grupie losowo wybranych chorych z zamkniętymi, tj. bez uszkodzenia skóry, złamaniami w obrębie kończyn dolnych prawidłowo gojącymi się i z zaburzeniami zrostu kostnego. W uzyskanych obrazach limfoscyntygraficznych stwierdziłem statystycznie znamienne zwiększenie pól powierzchni przedwęzłowych naczyń chłonnych na poziomie uda oraz pachwinowych węzłów chłonnych (indeksy odpowiednio 2.17 ± 1.41 i 1.78 ± 0.87 krotne) w grupie chorych z prawidłowo postępującym zrostem kostnym, oraz ich zmniejszenie (indeksy odpowiednio 0.98 ± 0.86 i 0.43 ± 0.24) w kończynach z zaburzeniami zrostu kostnego. Dodatkowo, u większości chorych z brakiem postępu gojenia złamania obserwowałem obecność odpływu chłonnego w tkankach głębokich oraz obecność podkolanowych węzłów chłonnych.

Wnioski

Uzyskane wyniki pokazały obecność korelacji między jakością procesów naprawczych przebiegających w miejscu urazu oraz odpływem chłonnym z miejsca urazu, liczbą komórek regionalnego węzła chłonnego i ich pobudzeniem. Prawidłowo postępujące gojenie współwystępowało ze zwiększeniem drenażu chłonnego i zwiększeniem liczby komórek regionalnego węzła chłonnego prowadzącej do jego powiększenia, natomiast zaburzenia zrostu kostnego – zmniejszenie drenażu chłonnego i zmniejszenie węzła chłonnego, oraz tworzenie alternatywnych dróg odpływu chłonnego.

Uzyskane wyniki wskazują na obecność czulego wskaźnika jakości postępującego zrostu kostnego w postaci węzła chłonnego drenującego miejsce złamania i przedwęzłowych naczyń chłonnych, co może być wykorzystywane we wczesnej diagnostyce zaburzeń gojenia złamań.

Praca V.

Wykazane przeze mnie w poprzednich pracach zwiększenie i przyspieszenie odpływu chłonnego, poszerzenie przedwęzłowych naczyń chłonnych oraz zwiększenie masy węzła korelujące z prawidłowo postępującym procesem gojenia złamania, może sugerować zależność między procesami komórkowymi w miejscu gojenia z procesami komórkowymi zachodzącymi w drenującym węzle chłonnym. To, czy i w jakim stopniu zmiany w węzłach korelują z procesami zachodzącymi w miejscu urazu na poziomie komórkowym i molekularnym, pozostawało niejasne.

Dla scharakteryzowania miejscowych procesów gojenia złamania i odzwierciedlających je zmian w regionalnych węzłach chłonnych porównywałem obrazy limfoscyntygraficzne z obrazami mikroskopowymi bioptatów pobranych ze szpar złamania w grupie chorych z prawidłowo postępującym zrostem kostnym i z jego zaburzeniami.

Stwierdziłem korelację jakości przebiegającego procesu gojenia z odpowiedzią węzła chłonnego drenującego szparę złamania. Tworzenie obfitych nacieków komórkowych z ogniskami kostnienia prawidłowo przebiegających zrostów kostnych korelowało z poszerzeniem obrazów przedwęzłowych naczyń i pachwinowych węzłów chłonnych, a obecność histologicznie skąpokomórkowych obszarów w obrębie szpar niegojących się złamań korelowało ze zmniejszeniem obrazów przedwęzłowych naczyń i pachwinowych węzłów chłonnych.

W preparatach histologicznych bioptatów pobranych ze szpar prawidłowo gojących się złamań występowały nacieki komórek HLA-DR+, CD68+, CD4+ (limfocyty T pomocnicze) i CD8+ (cytotoksyczne) oraz znaczna liczba komórek CD34+ (komórki pnia), z zaznaczoną ekspresją BMP2, kolagenu typu I-go i II-go, SDF1 i OPG, oraz z obecnością stref kostnienia. Szpary złamań powikłane zaburzeniami gojenia wykazywały obecność obszarów skąpokomórkowych z brakiem obszarów kostnienia, oraz mniejszą liczbę komórek HLA-DR+, makrofagów, komórek CD4+, CD8+, CD25+, CD22 i mniejszą ekspresję BMP2, kolagenu typu II-go, SDF1 i OPG.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie korelacji procesów gojenia na poziomie komórkowym i molekularnym z obrazem drenujących miejsce urazu naczyń i węzłów chłonnych. Obserwacje te sugerują, że zmiany w naczyniach i węzłach chłonnych są najprawdopodobniej wywołane antygenami, komórkami i czynnikami humoralnymi drenowanymi z miejsc urazu wraz z chłonką. Utrzymywanie się obserwowanych zmian w układzie chłonnym

kończyny wiele tygodni, a nawet miesięcy po urazie dowodzi uczestniczenia regionalnego węzła chłonnego w procesie gojenia i remodelowania blizny kostnej.

Praca VI.

Długotrwałe utrzymujące się objawy miejscowe procesu zapalnego toczącego się w miejscu złamania zamkniętego mogą być potencjalnie spowodowane kolonizacją szpary przełomu przez bakterie. Mogłoby do niej dochodzić wskutek zasiedlania uszkodzonych tkanek przez ciągłość w przypadku urazów otwartych, szerzenia się infekcji drogą chłonną z obwodu kończyny lub drogą krwionośną. Wiele obserwacji wskazuje też na możliwość stałego bytowania patogenów w fizjologicznie zdrowych tkankach, z możliwością rozwoju zakażenia przy wystąpieniu sprzyjających im warunków, np. doznanego urazu czy interwencji operacyjnej.

Pytanie, w jakim stopniu odczyn zapalny aktywowany w odpowiedzi na uraz w regionalnym węźle chłonnym, spowodowany jest uwalnianymi z gojących się tkanek własnymi antygenami, a na ile antygenami patogenów zasiedlających tkanki, pozostawał nieznanym.

Dla oceny występowania patogenów przeprowadziłem badania mikrobiologiczne i genetyczne (amplifikacja podjednostki 16S rRNA) szpar złamań zamkniętych kości długich kończyn dolnych nieprzejawiających cech infekcji. Badania wykazały obecność żywych komórek bakteryjnych w 14% złamań prawidłowo gojących się, i w 35% złamań z zaburzeniami zrostu kostnego, oraz obecność bakteryjnego materiału genetycznego w odpowiednio 39% i 42% złamań. Jednocześnie posiewy bakteriologiczne i oznaczenia 16S rRNA z okolicznych tkanek głębokich, podskórnej i mięśniowej, wykazały brak lub sporadyczne występowanie bakterii.

Szczepami zasiedlającymi były głównie gronkowce - *Staphylococcus epidermidis*, *warneri*, *capitis* i *hemolyticus*, oraz bakterie szczepów *Pseudomonas spp.* i *Micrococcus spp.*, wykazujące 95% podobieństwo ze szczepami zasiedlającymi skórę chorych. Nie stwierdzałem obecności grzybów, bakterii beztlenowych oraz szczepów tworzących formy przetrwalnikowe.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na obecności bakterii i ich materiału genetycznego w szparach złamań zamkniętych, zarówno gojących się prawidłowo jak i z zaburzeniami zrostu kostnego. Sugeruje to obecność patogenów w tkankach przed doznany urazem i wykonany zabieg operacyjny, co przemawia za stałym zasiedlaniem tkanek przez szczepy nie powodujące rozwinięcia pełnoobjawowego zakażenia. Szczepy te jednak mogą w sprzyjających warunkach stać się czynnikiem etiologicznym zakażenia wikłającego zmiany pourazowe i pooperacyjne. Brak klinicznych cech infekcji, takich jak przetoka ropna i/lub tworzenie ropnia, zaczerwienienie skóry i jej zwiększone ucieplenie, gorączka, podwyższenie OB i CRP, przy dodatnich wynikach amplifikacji 16S rRNA świadczą o tym, że obecność w szparze przełomu patogenów nie jest tożsamy z zakażeniem.

Znamiennie wyższa częstość występowania żywych bakterii w szparach niegojących się złamań (35% vs 14%) może świadczyć o korelacji subklinicznie przebiegającego ich bytowania (zasiedlenie) z zaburzeniami zrostu kostnego.

Interesującą obserwacją jest znamiennie wyższa częstość występowania patogenów w szparach złamań zamkniętych w porównaniu z okalającymi je głębokimi tkankami miękkimi

Praca VII.

Opisany przeze mnie brak różnic w częstości występowania bakteryjnego materiału genetycznego w szparach złamań gojących się prawidłowo i z zaburzeniami zrostu, przy znamiennych różnicach w częstości dodatnich posiewów, może sugerować predyspozycję do wzmożonej proliferacji bakterii w niegojących się złamaniach. Może to być spowodowane predyspozycją do zaburzeń eliminacji patogenów. Dla weryfikacji tej hipotezy dokonałem analizy częstości występowania punktowych mutacji genów dla czynników biorących udział w procesie gojenia (CCR2, IL-6, TGF-beta, CRP i IL-1ra), oraz rozpoznawania i eliminacji patogenów wikłających zrost kostny (CD14, TLR2 i TLR4).

Badania mikrobiologiczne pokazały obecność bakterii w szparach niegojących się złamań u 34 z 108 (31,5%) i w szparach gojących się prawidłowo u 20 z 122 chorych (16,4%; $p < 0,05$). Amplifikacja podjednostki 16S rRNA pokazała obecność bakteryjnego materiału genetycznego odpowiednio u 54 z 95 (56,8%) i u 75 z 115 chorych (65,2%; NS).

Badania mutacji przeprowadzone w grupach chorych z prawidłowo przebiegającym zrostem kostnym i jego zaburzeniami wykazały znamiennie wyższą ($p < 0,05$) częstość występowania polimorfizmu genu kodującego TLR4 w pozycji Asp299Gly. TLR4 jest istotnym receptorem umożliwiającym rozpoznawanie PAMP i mutacja genu kodującego TLR4 prowadzi do zaburzonej eliminacji patogenów, zwiększając ryzyko występowania infekcji.

Doniesienia literaturowe również wskazują na statystycznie większą częstość występowania mutacji w pozycji Asp299Gly genu dla TLR4 u chorych cierpiących na nawracające zapalenia płuc, infekcje w obrębie jamy ustanej i infekcje kostno – stawowe.

Wnioski

Uzyskane wyniki pokazały istnienie predyspozycji genetycznej do zaburzeń zrostu kostnego, najprawdopodobniej zależnej od negatywnego wpływu bakterii na proces gojenia, do której prowadzą zaburzenia mechanizmów eliminacji patogenów wywołane mutacją genu kodującego TLR4 w pozycji Asp299Gly.

Podsumowanie

W przedstawionym zbiorze prac własnych wykazałem aktywację regionalnego węzła chłonnego przez zarówno własne antygeny uwalniane z krwi (leukocyty wstrzykiwane podskórne) i szpiku kostnego (model otwarcia jamy szpikowej w złamaniu), ze stłuczonych tkanek miękkich łydki i stłuczonych tkanek całego podudzia (modele tępych urazów zamkniętych kończyny) jak i przez antygeny bakterii bytujących w skórze. W przeprowadzonych doświadczeniach największe nacieki i zwiększenie masy węzłów chłonnych wywoływały złamanie, wstrzyknięcie komórek szpiku i powtarzane iniekcje bakterii sugerując, że otwarcie jam szpikowych z wypływaniem szpiku między tkanki miękkie i zasiedlanie tkanek przez bakterie wywołują największe zmiany w węzłach chłonnych. Zmiany występujące miejscowo znajdowały swoje odzwierciedlenie w przyspieszeniu i zwiększeniu objętości drenażu chłonnego z kończyny, oraz powiększeniu węzła chłonnego drenującego miejsce urazu.

Zwiększenie odpływu chłonnego z kończyn po urazach mechanicznych obserwowano kilku autorów, zarówno w limfografiach bezpośrednich [20], limfoscintyografiach [21] jak i w limfograficznym rezonansie magnetycznym [22]. Uzyskiwane przy ich pomocy obrazy przedstawiały zwiększenie odpływu chłonnego z kończyny po urazie, oraz powiększenie jej węzłów chłonnych [23]. Jednak brak jest doniesień o próbach wyjaśnienia tego zjawiska.

Drenaż drogą chłonną do regionalnego węzła chłonnego autogennych erytrocytów i leukocytów krwi obwodowej wstrzykniętych podskórnie, oraz obecność komórek z antygenem klasy II (prezentujących antygen) w strefach podtorebkowych w preparatach histologicznych wykonanych z bioapatów węzłów chłonnych, świadczyły o aktywacji węzłów chłonnych wywołanych autoantygenami. Analogiczne zmiany miejscowe i wywołane nimi zmiany w regionalnych węzłach chłonnych obserwowałem po iniekcjach bakterii.

Obserwowane poszerzenia centrów namnażania, ze zwiększeniem gromadzenia się limfocytów i ich zwiększoną autotransformacją i zwiększoną odpowiedzią na mitogeny oraz zwiększoną odpowiedzią na antygeny własne (szpik i

leukocyty krwi obwodowej) i obce (atenuowane bakterie) są dowodem na aktywację odpowiedzi immunologicznej w węzłach chłonnych drenujących miejsca urazu w odpowiedzi na antygeny uwalniane z miejsca urazu. Zmiany w węzłach chłonnych drenujących gojące się tkanki korelują z jakością przebiegającego miejscowo procesu gojenia. Stwierdziłem poszerzenie naczyń świadczące o zwiększeniu drenażu chłonnego i powiększenie węzłów chłonnych w złamaniach gojących się prawidłowo, oraz zmniejszenie drenażu chłonnego ze zmniejszeniem węzła chłonnego w złamaniach powikłanych zaburzeniami zrостu kostnego.

Aktywacja miejscowego procesu zapalnego jest nierozdzielnie związana z procesem gojenia. Gromadzenie komórek zapalnych w postaci nacieków granulocytów, monocytów / makrofagów i limfocytów chroni zarówno przed patogenami potencjalnie zasiedlającymi uszkodzone tkanki, jak i reguluje przebiegiem procesu gojenia [24]. Rola poszczególnych populacji komórkowych układu odpornościowego w procesie gojenia została scharakteryzowana w licznych badaniach doświadczalnych i obserwacjach przebiegu gojenia u chorych z brakiem lub defektem danej populacji komórek. Badano m.in. różnice przebiegu gojenia w życiu płodowym i u osobników dorosłych, u chorych z neutropenią, po splenektomii, czy doświadczalnej deplecji poszczególnych populacji komórek zapalnych, koncentrując się na ich roli w obrębie samej rany [25]. W literaturze brak prób scharakteryzowania roli układu odpornościowego w regulacji procesów gojenia.

Obfite nacieki komórkowe w szparach złamań gojących się prawidłowo towarzyszyło zwiększenie odpływu chłonnego i powiększenie węzła chłonnego. Było to najprawdopodobniej spowodowane aktywacją przez uwalniane z tkanki antygeny i przez czynniki drenowane z miejsc urazu wraz z chłonką, wywołujące miejscowe gromadzenie się (chemokiny) i aktywację (cytokiny, czynniki wzrostu) komórek naciekających uszkodzone tkanki i aktywujące komórki węzła. Utrzymujące się wiele miesięcy, a nawet lat po złamaniu, zwiększony drenaż chłonny i powiększenie regionalnego węzła chłonnego, mogą świadczyć o stałej aktywacji układu chłonnego kończyny przez antygeny i czynniki humoralne uwalniane z miejsca urazu.

Interesującą obserwacją u chorych ze złamaniami zamkniętymi kości długich kończyn dolnych było stwierdzenie obecności w bioptatach pobieranych ze szpar złamania materiału genetycznego bakterii i uzyskiwania dodatnich posiewów bakteriologicznych. Jest to dowodem na obecność bakterii w obrębie złamania sugerując, przy urazach zamkniętych, stałe ich bytowanie w tkankach. Jest to istotna obserwacja, gdyż szczepy zasiedlające tkanki głębokie mogą stanowić źródło infekcji wnikających doznane urazy i wykonywane zabiegi operacyjne.

Próbując wyjaśnić przyczynę zaburzonego gojenia złamań wnikanych obecnością bakterii w szparze przelomu stwierdziłem nosicielstwo mutacji genu dla TLR4 w pozycji Asp299Gly, odpowiedzialnej za zaburzenia eliminacji bakterii.

Wnioski

1. Węzeł chłonny drenujący miejsce urazu mechanicznego i zakażone w nim tkanki jest aktywowany, co wyraża się poszerzeniem naczyń chłonnych i powiększeniem węzłów oraz aktywacją ich populacji komórkowych.
2. Odpowiedź węzła chłonnego jest spowodowana przez uwalnianie z tkanek antygeny własne i bakterie zasiedlające tkanki.
3. Istnieje predyspozycja genetyczna do zaburzeń rozpoznawania i eliminacji bakterii, zwiększająca ryzyko rozwoju zakażenia i wywołanego nim zaburzeń gojenia złamania, u nosicieli mutacji genu dla TLR4 w pozycji Asp299Gly.

Aspekty praktyczne wynikające z pracy

Stwierdzona korelacja obrazu układu chłonnego drenującego miejsce gojenia z jakością przebiegającego procesu gojenia złamania może stać się narzędziem diagnostycznym służącym do prognozowania zaburzeń gojenia już w ich wczesnych fazach.

Wysoka częstość występowania bakterii w tkankach i ich upośledzona eliminacja ze szpar niegojących się złamań wskazuje na konieczność stosowania skutecznych metod eliminacji patogenów.

Stwierdzenie predyspozycji genetycznych punktowej mutacji genu kodującego TLR4 w przypadkach trudno gojących się złamań powinno być wskazaniem do intensywnej terapii antybakteryjnej.

Piśmiennictwo

- 1 Bostrom MP, Camacho NP: Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Rel Res.* 1998;355 (Suppl):S274-82.
- 2 Brumback RJ, Ellison TS, Poka A, Bathon GH, Burgess AR: Intramedullary nailing of femoral shaft fractures. Part III: Long-term effects of static interlocking fixation. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74(1):106-12.
- 3 Grazier, KL, Holbrook TL, Kelsey JL et al.: The frequency of occurrence, impact and cost of musculoskeletal conditions in the United States American Academy of Orthopedic Surgeons, 1984, Chicago, IL.
- 4 Boyd HB, Lipinski SW, Wiley JH: Observations on Non-Union of the Shafts of the Long Bones, with a Statistical Analysis of 842 Patients. *J Bone Joint Surg. Am.* 1961;43:159-168.
- 5 Le AX, Hu MD, Helms JA: Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res.* 2001;19:78-84.
- 6 Svindland A, Nordsletten L, Reikerås O, Skjeldal S: Tourniquet ischemia induces periosteal proliferation in the rat tibia. *Acta Orthop Scand.* 1995;66:468-472.
- 7 Hausman MR, Rinker BD: Intractable wounds and infections: the role of impaired vascularity and advanced surgical methods for treatment. *Am J Surg.* 2004;187(5A):S44-S55.
- 8 Cleveland KB: Delayed union and non-union of fractures. W: Canale ST, Beaty JH: *Campbell's Operative Orthopedics.* Tom III, Mosby, Elsevier, 2008, str.3529-3574.
- 9 Aspenberg P: Drugs and fracture repair. *Acta Orthop.* 2005;76(6):741-8.
- 10 Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV: Pharmacological agents and impairment of fracture healing: What is the evidence? *Injury, Int. J. Care Injured* 2008;39:384-394.
- 11 Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA: The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(6):1032-44.
- 12 Brownlow HC, Reed A, Simpson AH: Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury.* 2001;32(7):519-24.
- 13 Agus H, Kalenderer O, Ozcalabi IT, Arslantas M: Treatment of infected defect pseudoarthrosis of the tibia by in situ fibular transfer in children. *Injury.* 2005;36:1476-9.
- 14 Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G, Pani S, Kumaraswami V, Kubicka U, Łukomska B, Tripathi FM, Swoboda E, Meisel-Mikolajczyk F, Stelmach E, Zaleska M: Bacteriological studies of blood, tissue fluid, lymph and lymph nodes in patients with acute dermatolymphangioadenitis (DLA) in course of 'filarial' lymphedema. *Acta Trop.* 1999 15;73(3):217-24.
- 15 Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.
- 16 Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL: Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med.* 2007;13(7):851-6.
- 17 Szczęsny G, Nolte D, Veihelmann A, Messmer K: A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma.* 2000;49(6):1108-15.
- 18 Szczęsny G, Veihelmann A, Nolte D, Messmer K: Changes in the local blood and lymph microcirculation in response to direct mechanical trauma applied to leg: in vivo study in an animal model. *J Trauma.* 2001;51(3):508-17.
- 19 Szczęsny G, Olszewski WL: Lymphatic and venous changes in lower limbs after mechanical trauma. *Progr in Lymphol.* 2000;33(suppl):117-120
- 20 Kaindl F, Mannheimer E. Lymphgefessveränderungen nach lokaler Schädigung. *Langenbecks Arch Chir* 1970;327:162-5.
- 21 Kittner C, Kroger J, Rohrbeck R, Parnitzke B, Decker S, Lakner V: Lymphabstromszintigraphie bei einem artefiziellen Oedem des Unterschenkels. *Nuklearmedizin.* 1994;33:268-70.
- 22 Lohrmann C, Pache G, Felmerer G, Foeldi E, Schaefer O, Langer M: Posttraumatic edema of the lower extremities: evaluation of the lymphatic vessels with magnetic resonance lymphangiography. *J Vasc Surg.* 2009;49(2):417-23.
- 23 Czepelenko GV: Kliniko-limfograficestaja diagnostika posstrawmaticieskowo otieka pri zamieszczenii defektow kostiej. *Vest Khir Im Grekova.* 1987;138:36-8.
- 24 Park JE, Barbul A: Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187(5;Suppl.1):S11-S16.
- 25 Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A: Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(5):517-27.