

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ ПЕРЕЛОМЕ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ

© 2019 г. К. С. Абрамов*, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков

*E-mail: kirill-abramov86@mail.ru

¹ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет России, Челябинск, Россия

Поступила: 24.05.2019. Принята: 28.06.2019

Исследованы цитометрические показатели апоптоза и пролиферации у 20 мужчин с изолированным переломом бедренной кости в условиях применения системной озонотерапии. Показано, что при переломе бедренной кости имеет место повышение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов с экспрессией рецепторов готовности к реализации апоптоза и уровня лимфоцитов с цитометрическими признаками апоптоза (гиподиплоидный пик). Применение озонотерапии позитивно влияет на механизмы выживаемости иммунных клеток, вне зависимости от их фенотипа, за счет повышения экспрессии bcl-2 до значений контрольной группы, что можно расценивать как один из механизмов, позволяющих регулировать и проводить отбор эффективных В-лимфоцитов, способных наработать достаточный уровень противинфекционных антител в ответ на травму.

Ключевые слова: перелом бедра, озонотерапия, апоптоз, пролиферация

DOI: 10.31857/S102872210007230-8

Адрес: Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Абрамов Кирилл Сергеевич. Тел.: +7904971 61 52

E-mail: kirill-abramov86@mail.ru

Авторы:

Абрамов К. С., старший лаборант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Давыдова Е. В., д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Осиков М. В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистическим данным, травматическое повреждение бедренной кости в результате дорожно-транспортных происшествий составляет до 10%, что в абсолютных значениях составляет от 1 до 3 млн. человек [1]. Уже в первые минуты после травмы происходит включение

системного ответа организма, ведущим звеном в котором играют нейро-иммуноэндокринные механизмы реагирования [2]. Эффективность хирургического лечения, сроки репарации костной ткани во многом зависят от реализации са-ногенетических процессов как в самой костной ткани, так и в виде функциональной интеграции с другими системами организма. Далеко не последнюю роль в процессах репарации костной ткани играют процессы резорбции и остеогенеза, обеспечиваемые в том числе и секреторными продуктами иммунных клеток и их количественным соотношением [3].

В настоящее время при лечении травматических повреждений опорно-двигательного аппарата наряду с хирургическими методами лечения, активно применяются методы эфферентной терапии, в этом плане перспективно применение озонотерапии, поскольку механизм терапевтического действия озона многогранен [4]. Поступление озона в организм приводит к умеренному окислительному стрессу, прежде всего, за счет взаимодействия с полиненасыщенными

жирными кислотами и водой, генерации активных метаболитов кислорода, проявляя свои бактерицидные, антиоксидантные свойства. Известны и иммуномодулирующие свойства озона и его метаболитов, с успехом применяемые для лечения различной хронической хирургической патологии.

Цель исследования заключалась в сравнительной оценке показателей апоптоза и пролиферации при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 20 пациентов мужского пола с изолированным переломом бедренной кости, средний возраст $43,5 \pm 5,4$ года, находящихся на лечении в отделении травматологии и ортопедии № 2 ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница. Всем пациентам до начала хирургического лечения на 5–7 сутки после травмы производился забор венозной крови для иммунологического обследования, натошак (вторая группа, $n=20$). Со вторых суток после оперативного лечения пациенты получали озонотерапию в виде процедуры малой аутогемотерапии (МАГТ) на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона УОТА-60-01 «Медозон» производства ООО «Медозон», Москва. Концентрация озона в озонкислородной смеси составляла 20 мг/л, в объеме 10 мл. Объем венозной крови составлял 10 мл. Вводили внутримышечно, в ягодичную или бедренную область. Курс 7–9 инъекций через день. Сразу после окончания курса МАГТ производили контрольный забор венозной крови для иммунологического тестирования (третья группа, $n=20$). Контрольную группу составили 30 условно здоровых мужчин, средний возраст $48,5 \pm 5,2$ года (первая группа). Иммунологическое исследование крови проводили на проточном цитофлюориметре *Becton Dickinson FACSCanto 10*. Непосредственно для окрашивания нами были использованы двухпараметрические реагенты линии *IOTest*. Окрашивание моноклональными антителами проводили в цельной крови. По окончании инкубации проводили лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов с использованием лизирующего комплекта реагентов *Immuno-Prep™*. Полученные данные анализировали в рамках программы *CellQuest*.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программы *Statistica 10.0*.

Используя критерий Манна-Уитни, различия считали достоверными при $p < 0,05$. [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные, параметров апоптоза и пролиферации лимфоцитов при изолированном переломе бедренной кости, в условиях системной озонотерапии, представленные в **Таблице 1**, показывают, что в ответ на травму происходит абсолютное и относительное повышение экспрессии рецепторов готовности к реализации апоптоза на Т-лимфоцитах и абсолютного числа общей популяции лимфоцитов с цитометрическими признаками апоптоза, регистрируемыми по выраженности гиподиплоидного пика в сравнении с контрольной группой. После курса озонотерапии показатели апоптоза лимфоцитов не претерпевали значительных изменений, в сравнении с показателями второй группы. Известно, что при активации клеток $CD95^+$ в большей степени экспрессируется на $CD4^+$ -позитивных клетках, и, взаимодействуя с *FasL* в виде мембраноассоциированного или растворимого белка *Fas/CD95⁺*, становится основным механизмом апоптотической гибели клеток-мишеней при инфекционно-воспалительных процессах в организме. При этом лимфоциты, находящиеся в состоянии пролиферации (фаза митоза) во всех группах не имели достоверных различий, однако, индекс соотношения пролиферации/апоптоза в контрольной группе был значимо более высоким. Пролиферация как проявление активации иммунных клеток носит «позитивный» характер, при этом численность клеток, находящихся в фазе пролиферации ($S+G2+M$), на фоне применения озонотерапии существенно не отличается от показателей контрольной группы и до лечения.

Для оценки вклада антиапоптогенного белка *bcl-2* в механизмы выживаемости лимфоцитов при переломе бедра и в условиях применения озонотерапии нами проведено цитометрическое определение экспрессии ингибитора апоптоза *bcl-2* на Т- и В-лимфоцитах. Установлено, что при травме бедра экспрессия *bcl-2* на Т- и В-лимфоцитах снижена и достигает уровня контрольной группы, после применения озонотерапии, что свидетельствует о позитивном влиянии озона на механизмы выживаемости иммунных клеток, вне зависимости от их фенотипа. Известно, что *bcl-2* функционирует как антиапоптогенный фактор, связывающий и инактивирующий проапоптотический белок

Таблица 1. Показатели апоптоза и пролиферации лимфоцитов в условиях применения озонотерапии

| Параметры | | Группа 1 Контрольная n=10 | Группа 2 Пациенты с переломом бедра до лечения n=20 | Группа 3 Пациенты после озонотерапии n=20 | p |
|--|-----|---------------------------------|--|--|--|
| Апоптоз (гиподиплоидный пик) | % | 4,65 ± 0,41 | 6,83 ± 0,18 | 7,23 ± 0,12 | |
| | abs | 0,02 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{1-3}} |
| Фаза митоза (пролиферация) (S+G2+M) | % | 4,13 ± 1,15 | 3,14 ± 1,4 | 3,28 ± 1,23 | |
| | abs | 0,16 ± 0,01 | 0,14 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 | |
| Индекс пролиферации/апоптоза | | 6,8 ± 0,1 | 1,2 ± 0,02 | 1,62 ± 0,03 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{1-3}} |
| CD3 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, % | | 15,2 ± 1,46 | 28,3 ± 4,15 | 36,2 ± 6,2 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{1-3}} |
| CD3 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, × 10 ⁶ | | 218,3 ± 11,8 | 680,1 ± 21,7 | 870,1 ± 20,1 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{1-3}} |
| CD20 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, % | | 8,2 ± 0,23 | 8,8 ± 0,3 | 8,9 ± 0,1 | |
| CD20 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, × 10 ⁶ abs | | 19,2 ± 1,2 | 20,5 ± 1,3 | 21,3 ± 1,6 | |
| CD3 ⁺ bcl-2 лимфоциты, % | | 0,46 ± 0,2 | 0,35 ± 0,8 | 0,45 ± 0,1 | |
| CD3 ⁺ bcl-2 лимфоциты, × 10 ⁶ | | 12,3 ± 0,3 | 8,0 ± 0,4 | 10,1 ± 0,1 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{2-3}} |
| CD20 ⁺ bcl-2 лимфоциты, % | | 4,26 ± 0,6 | 1,25 ± 0,5 | 5,53 ± 1,7 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{2-3}} |
| CD20 ⁺ bcl-2 лимфоциты, × 10 ⁶ | | 4,9 ± 0,03 | 2,1 ± 0,02 | 7,2 ± 0,1 | <0,01 _{1-2}} <0,01 _{2-3}} |

Примечание: p – показатель значимости различий между группами по критерию Манна-Уитни

Вах с формированием комплекса с фактором апоптоза АРАF1, предотвращая способность последнего активировать каспаза-зависимый путь апоптоза. Примечательно, что при развитии В-клеток bcl-2 экспрессируется на всех стадиях развития клетки и повышение его экспрессии после применения озонотерапии, можно расценить как один из механизмов, позволяющих регулировать и проводить отбор только эффективных В-лимфоцитов, способных наработать достаточный уровень противинфекционных антител в ответ на травму.

ВЫВОДЫ

1. Изолированный перелом бедренной кости сопровождается абсолютным и относительным повышением числа клеток с экспрессией рецепторов готовности к реализации апоптоза на Т-лимфоцитах и лимфоцитов с цитометрическими признаками апоптоза.

2. Применение озонотерапии в комплексном лечении переломов бедренной кости позволя-

ет нормализовать уровень антиапоптогенного фактора bcl-2 на Т- и В-лимфоцитах снижена до значений контрольной группы.

3. Показатели пролиферации как проявления активации иммунных клеток, на фоне применения озонотерапии не имеют различий с показателями контрольной группы и до лечения, за исключением индекса соотношения пролиферации/апоптоза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Губайдуллин М. И., Зарков С. И. Медико-социальная оценка случаев с благоприятными исходами дорожно-транспортных травм на госпитальном этапе. Современные проблемы науки и образования. 2012, 1. [Электр. ресурс] (URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5513>) [Gubaydullin M. I., Zarkov S. I. Medico-social assessment of cases with favorable outcomes of road traffic injuries at the hospital stage. Modern problems of science and education. 2012, 1. [An electronic resource] (URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5513>).

2. *Amarante-Mendes G.P., Adjemian S., Branco L. M.* Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol.* 2018, 9:2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379.
3. *Осиков М. В., Давыдова Е. В., Абрамов К. С.* Врожденный иммунитет при изолированных переломах бедренной кости. Современные проблемы науки и образования. 2019, 1. [Электр. ресурс] (URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28540>). [*Osikov M. V., Davydova E. V., Abramov K. S.* Congenital immunity in isolated fractures of the femur. *Modern problems of science and education.* 2019, 1. [An electronic resource] URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28540>)
4. *Sweet F., Kao M.-S., Lee S.-C. D., Hagar W. L., Sweet W. E.* Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science.* 1980; 209(4459): 931–933.
5. *Медик В. А., Токмачев М. С., Фишман Б. Б.* Статистика в медицине и биологии. «Теоретическая статистика». Под ред. Комарова Ю. М.. Медицина, Москва, 2000, 1, 454. [*Medik V. A., Tokmachev M. S., Fishman B. B.* Statistika in medicine and biology. “Theoretical statistics”. Under the editorship of Yu. M. Komarov. *Medicine, Moscow, 2000, 1, 454.*]

COMPARATIVE EVALUATION OF INDICATORS OF APOPTOSIS AND PROLIFERATION IN THE ISOLATED FRACTURE OF THE FEMORAL BONE IN CONDITIONS OF SYSTEM OZONOTHERAPY

© 2019 K. S. Abramov*, E. V. Davydova, M. V. Osikov

*E-mail: kirill-abramov86@mail.ru

South Ural State Medical University” of the Ministry of Health of Russia,
Chelyabinsk, Russia

Received: 24.05.2019. Accepted: 28.06.2019

The cytometric parameters of apoptosis and proliferation were studied in 20 men with an isolated fracture of the femur under the conditions of using systemic ozone therapy. It is shown that in case of a fracture of the femur, there is an increase in the absolute and relative number of T-lymphocytes with the expression of receptor readiness for apoptosis and the level of lymphocytes with cytometric signs of apoptosis (hypodiploid peak). The use of ozone therapy has a positive effect on the mechanisms of survival of immune cells, regardless of their phenotype, by increasing the expression of bcl-2 to the values of the control group, which can be regarded as one of the mechanisms that allow to regulate and carry out the selection of effective B-lymphocytes capable of accumulating a sufficient anti-infective antibodies in response to injury.

Key words: hip fracture, ozone therapy, apoptosis, proliferation

Authors:

Abramov K. S., ✉ Senior Laboratory Assistant, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia. Phone: +7904971 61 52.

E-mail: kirill-abramov86@mail.ru;

Davydova E. V., MD, associate professor, professor of the Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

Osikov M. V., MD, Professor, Head. Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia.