

На правах рукописи

АБРАМОВ
Кирилл Сергеевич

**РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ
И ИММУННОГО СТАТУСА В РЕПАРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ
ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ ПЕРЕЛОМЕ БЕДРЕННОЙ КОСТИ
В УСЛОВИЯХ ОЗОНОТЕРАПИИ**

3.3.3 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск – 2021

Работа выполнена на кафедре Патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Осиков

Михаил Владимирович

доктор медицинских наук, доцент

Давыдова

Евгения Валерьевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, директор Владивостокского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток

Гвозденко

Татьяна Александровна

Доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела общей патологии ЦНИЛ, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург

Базарный

Владимир Викторович

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «23» декабря 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д208.065.04 на базе ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России и на сайте <http://omsk-osma.ru>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.м.н., доцент

Корпачева Ольга Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ежегодно в мире фиксируется более 1,3 млн смертей от последствий дорожно-транспортных травм. По данным Росстата, за 2019 г. переломы костей нижней конечности регистрировались в 713,4 случая на 100 тыс. населения России. Травматические высокоэнергетические переломы бедренной кости наиболее распространены среди молодых людей трудоспособного возраста, чему способствуют развитие профессионального спорта высоких достижений, многоэтажное строительство, темпы урбанизации, скоростной режим автострад (Alobaidi A. S. et al., 2016; Vommakanti K. et al., 2018). В структуре переломов длинных трубчатых костей на долю бедренной кости приходится до 25% случаев, в том числе с повреждениями средней трети диафиза – до 60%; ежегодный риск таких переломов составляет в мире от 1 до 3 млн случаев в год (Agarwal-Harding K. J. et al., 2015).

В ответ на травматическое повреждение тканей при переломах длинных трубчатых костей происходит активация нейроэндокринных механизмов стресса, системы иммунобиологического надзора, гемостаза уже через несколько минут после травмы (Lord J. M. et al., 2014). Ключевую позицию в системных реакциях организма в ответ на обширное повреждение тканей занимают факторы иммунной системы (Hazeldine J. et al., 2017; Seshadri A. et al., 2017). Расширение зоны альтерации является результатом высвобождения эндогенных факторов DAMPs, миграции в очаг воспалительных клеток, генерации активных форм кислорода, вызывающих окислительную деструкцию липидов и белков, фагоцитоза, образования нейтрофильных внутриклеточных ловушек и других факторов (Itagaki K. et al., 2015; Timmermans K. et al., 2016; Hazeldine J. et al., 2017; Jorch S. K. et al., 2017; Seshadri A. et al., 2017). Избыточная продукция нейтрофилами и моноцитами/макрофагами активных форм кислорода, матриксных металлопротеиназ и других протеаз, лактата, провоспалительных цитокинов, а также одновременная активация вегетативной нервной системы в совокупности приводят к глобальной дисфункции и повреждению эндотелия (Kottke M. A. et al., 2016; Loi F. et al., 2016; Billiar T. R. et al., 2017; Johansson P. I. et al., 2017). Генерация активных форм кислорода, вызывающая изменения редокс-статуса, способствует расширению зоны альтерации, усугублению дисфункции эндотелия и эндотоксикозу (Timmermans K. et al., 2016; Hazeldine J. et al., 2017; Jorch S. K. et al., 2017; Seshadri A. et al., 2017). В контексте рассматриваемой проблемы изменений иммунного статуса и процессов свободнорадикального окисления представляют интерес направления вмешательства в редокс-статус и иммунокоррекция у пациентов с высокоэнергетическими травматическими переломами бедренной кости.

Степень разработанности темы диссертационного исследования. Недостаточное понимание функциональной интеграции и регуляции ключевых гомеостатических систем организма в ответ на травматическое повреждение

тканей при переломах длинных трубчатых костей, включая факторы врожденного и адаптивного иммунитета, редокс-статус, является основным препятствием для создания инновационных методов лечения. Механизмы формирования провоспалительного иммунного ответа и одновременно сопутствующей ему иммуносупрессии в ответ на травму до конца не изучены. Реакции врожденного иммунитета могут привести к повреждению и дисфункции эндотелия, что облегчает выход в ткани PAMPs и DAMPs, активирует иммунные реакции, замыкает порочный круг повреждения тканей на ранних этапах после травмы, приводит к возникновению инфекционных осложнений, сепсиса, синдрома полиорганной дисфункции (MODS) (Kottke M. A. et al., 2016; Billiar T. R. et al., 2017). Патогенетически обоснованным методом модуляции иммунного и редокс-статуса при переломах бедренной кости может выступать озонотерапия, эффективность которой продемонстрирована в лечении широкого спектра терапевтической и хирургической патологии (Захватов А. Н. и соавт., 2016; Торгашин А. Н. и соавт., 2019; Rowen R. J. et al., 2019). Малая аутогемоозонотерапия (МАГОТ) является одним из вариантов системной озонотерапии и входит в номенклатуру медицинских услуг под рубрикой А20.30.024.007 (приказ МЗ РФ от 13.10.2017 № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг»). Механизм терапевтического действия озона многогранен и включает прооксидантные и антиоксидантные, иммуномодулирующие, антигипоксические свойства, регуляцию репарации тканей (Масленников О. В., Конторщикова К. Н., 2011; Vocci V. et al., 2015; Martinez-Sanchez G. et al., 2020, 2021).

Цель исследования: изучить роль процессов свободнорадикального окисления, иммунного статуса в репарации костной ткани при изолированном переломе бедренной кости в условиях озонотерапии.

Задачи исследования:

1. Изучить клинические, инструментальные признаки формирования костного регенерата, концентрацию маркеров резорбции и репарации костной ткани в крови в динамике изолированного перелома бедренной кости.

2. Исследовать количественный состав лейкоцитов, популяционный и субпопуляционный спектр, показатели позитивной и негативной активации лимфоцитов, функциональную активность моноцитов и нейтрофилов в крови, концентрацию в сыворотке ИЛ-6 и ИЛ-4 в динамике изолированного перелома бедренной кости.

3. Оценить показатели свободнорадикальной деструкции липидов и белков в плазме в динамике изолированного перелома бедренной кости.

4. Выявить характер связей между показателями метаболизма костной ткани и параметрами врожденного и адаптивного иммунитета, свободнорадикального окисления при изолированном переломе бедренной кости.

5. Исследовать клинические, инструментальные признаки формирования костного регенерата, концентрацию маркеров резорбции и репарации в крови при изолированном переломе бедренной кости в условиях озонотерапии.

6. Изучить количественный состав лейкоцитов, популяционный и субпопуляционный спектр, показатели позитивной и негативной активации лимфоцитов, функциональную активность моноцитов и нейтрофилов в крови, концентрацию в сыворотке IL-6 и IL-4 при изолированном переломе бедренной кости в условиях озонотерапии.

7. Исследовать показатели свободнорадикальной деструкции липидов и белков при изолированном переломе бедренной кости в условиях озонотерапии.

Научная новизна исследования. Впервые в динамике изолированного перелома бедренной кости проведено комплексное изучение клинико-инструментальных показателей формирования регенерата костной мозоли, показателей метаболизма костной ткани, врожденного и адаптивного иммунитета, окислительной деструкции липидов и белков в крови. Продемонстрировано, что от 7-х к 90-м суткам после изолированного перелома бедренной кости повышение концентрации в сыворотке маркеров резорбции и репарации костной ткани происходит по мере увеличения минеральной плотности кости и консолидации перелома. Впервые показана ассоциация показателей резорбции и репарации костной ткани с показателями иммунного статуса и свободнорадикальной деструкции липидов и белков в крови. Уточнены некоторые аспекты патогенеза изолированного перелома бедренной кости, в частности, роль поглотительной и НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов в крови, адгезивной, пролиферативной и МТТ-редуцирующей активности моноцитов в крови, повышения концентрации в сыворотке IL-6, IL-4, количества в крови CD3⁺CD4⁺, CD45RO⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD95⁺, лимфоцитов с признаками апоптоза и пролиферации, снижения количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих Bcl-2. В динамике изолированного перелома бедренной кости показано накопление первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов – в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы, первичных, вторичных продуктов окислительной модификации белков основного и нейтрального характера в плазме.

Впервые в комплексном лечении изолированного перелома бедренной кости применена системная озонотерапия в варианте малой аутогеомоозонотерапии (заявка на изобретение № 2020144349 от 31.12.2020 «Способ консервативного лечения пациентов с изолированным переломом бедренной кости при использовании системной озонотерапии»). Представлены данные о влиянии малой аутогеомоозонотерапии на ремоделирование костного регенерата и сокращение сроков консолидации перелома. Иммуномодулирующее действие малой аутогеомоозонотерапии включает повышение кислород-зависимого метаболизма моноцитов и нейтрофилов крови, снижение до показателей здоровых лиц количества Т-лимфоцитов, в том числе CD3⁺CD4⁺, CD45RO⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, лимфоцитов с признаками апоптоза, повышение количества CD3⁺, экспрессирующих Bcl-2, в крови, количества эритроцитов,

гемоглобина и гематокрита. Применение малой аутогемоозонотерапии при изолированном переломе бедренной кости продемонстрировало ограничивающее влияние на процессы окислительной деструкции липидов и белков в виде снижения концентрации в плазме первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов – в изопропанольной фазе липидного экстракта, первичных, вторичных продуктов окислительной модификации белков основного и нейтрального характера в спонтанном и металл-катализируемом режиме и восстановление резервно-адаптационного потенциала плазмы.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В ходе проведенного исследования уточнены некоторые аспекты патогенеза изолированного перелома бедренной кости, получены новые фундаментальные знания об изменении иммунного и редокс-статуса, расширяющие современные представления о роли врожденного и адаптивного иммунитета, процессов свободнорадикального окисления в патогенезе данной патологии. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых терапевтических подходов в травматологической практике. В работе представлены данные о положительном влиянии системной озонотерапии в варианте малой аутогемоозонотерапии на ремоделирование костного регенерата и сроки консолидации перелома. С патогенетических позиций обосновано применение малой аутогемоозонотерапии в комплексном лечении пациентов с изолированным переломом бедренной кости. Показан иммуномодулирующий и ограничивающий окислительную деструкцию липидов и белков в плазме эффект аутогемоозонотерапии за счет коррекции показателей врожденного и адаптивного иммунитета, снижения содержания в плазме окисленных дериватов липидов и белков. Представленные в работе результаты являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований и включения системной озонотерапии в комплексное лечение переломов костей.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы была спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. Организация исследования одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 15.03.2019, протокол № 2 от 24.02.2021). В исследование, согласно критериям отбора, включены 70 мужчин с верифицированным диагнозом: S72.3 Перелом диафиза бедренной кости по МКБ-10 и универсальной классификации переломов AO/ASIF. Методы исследования включали клинично-инструментальные, гематологические, биохимические, иммунологические, статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При изолированном переломе бедренной кости изменения маркеров репарации костной ткани сопровождаются изменением показателей иммунного статуса, накоплением продуктов окислительной деструкции липидов и белков в крови.

2. Применение малой аутогемоозонотерапии при изолированном переломе бедренной кости оказывает положительное влияние на ремоделирование костного регенерата и сокращает сроки консолидации перелома.

3. Механизм влияния малой аутогемоозонотерапии на репарацию костной ткани включает иммуномодулирующий и ограничивающий окислительную деструкцию липидов и белков в крови.

Степень достоверности, апробация результатов. Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений, полноте и широте литературно-библиографической справки, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с применением лицензионного пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19.

Основные положения диссертации представлены на XIV и XV Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2019, 2020); «Объединенном иммунологическом форуме» (Новосибирск, 2019); I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы» (Самара, 2020); XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (Санкт-Петербург, 2021).

Личный вклад автора в проведенное исследование. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования. Планирование научной работы, включая формулировку основной идеи и рабочей гипотезы, постановку цели и задач, разработку дизайна исследования, проводилось совместно с научными руководителями. Выбор и обоснование методов исследования, набор, анализ и интерпретация экспериментального материала, поиск, анализ и обобщение данных отечественной и зарубежной научной литературы, статистическая обработка данных, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, написание и оформление рукописи выполнены лично автором. Клинические, инструментальные, биохимические, иммунологические исследования выполнены автором лично и при участии сотрудников отделения компьютерной томографии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», сотрудников Центральной научно-исследовательской лаборатории и Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии, научную работу кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, научную работу научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, практическую работу отделения травматологии и ортопедии № 2 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 9 работ опубликовано в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России (из них 2 – на электронном ресурсе), в том числе 1 статья – в журнале «Вестник РГМУ», 1 статья – в журнале «Медицинская иммунология», входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Web of Science, Scopus), 1 статья – в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», 3 – в материалах конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, изложения результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Библиографический указатель включает 306 источников литературы, из них 49 отечественных и 257 зарубежных. Работа содержит 34 таблицы и 10 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в период 2017–2021 гг. на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России и в отделении травматологии и ортопедии № 2 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» с соблюдением этических принципов, изложенных в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра (Токио, 2010) с учетом примечаний к параграфу 29, внесенных Генеральной ассамблеей ВМА (Вашингтон, 2002, поправки от 2011 г.); в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266; одобрено решением этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 15.03.2019, протокол № 2 от 24.02.2021).

Основную группу исследования, согласно критериям включения, составили 70 пациентов мужского пола с неосложненным закрытым изолированным переломом диафиза бедренной кости в возрастном интервале 45–59 лет, поступивших в отделение травматологии и ортопедии № 2 ГБУЗ «ЧОКБ» на оперативное лечение на 5-е сутки после травмы. При отборе пациентов критериями исключения являлись: заболевания сердца, сосудов, легких, почек, ЖКТ в стадии обострения, системы крови, иммунодефицитные, аутоиммунные и лимфопролиферативные заболевания, снижение минеральной плотности костной ткани (МПК) менее 2,5 SD от референсных значений для данного возрастного периода. Верификацию диагноза перелома бедренной кости проводили в соответствии с МКБ-10 [S72.3 Перелом тела (диафиза) бедренной кости] и универсальной классификацией переломов AO/ASIF (Muller M. E., 1986),

согласно которой все переломы классифицированы как 32А или 32В. Из 70 пациентов основной группы методом простой рандомизации были сформированы две равновеликие группы: группу 2 (n=35) составили пациенты с изолированным переломом бедренной кости (ИПБК) в возрасте (Me (Q₂₅; Q₇₅)) 47,8 (47,2; 49,4) года, которым проводилась только стандартная консервативная терапия, включающая антибиотикотерапию и НПВС; группу 3 (n=35) – пациенты в возрасте 48,1 (47,6; 48,4) года, которым начиная с 8-х суток после травмы (2-е сутки после оперативного лечения), помимо стандартной терапии, проводили процедуру малой аутогемоозонотерапии (МАГОТ). Контрольную группу 1 составили 30 здоровых мужчин в возрасте 48,3 (47,6; 48,5) года. Все группы были сопоставимы по возрастным характеристикам и наличию сопутствующей соматической патологии вне обострения, что отвечает требованиям исследования. На 7-е сутки после травмы всем пациентам групп 2 и 3 проводилась закрытая репозиция отломков с последующим блокируемым интрамедуллярным остеосинтезом. В таблице 1 представлены перечень исследований и сроки динамического наблюдения.

Таблица 1 – Перечень исследований, выполняемых в зависимости от группы объектов исследования, и сроки их проведения

Исследования	Группа 1 Здоровые, n=30	Группа 2 ИПБК, n=35	Группа 3 ИПБК + МАГОТ, n=35
Клинический осмотр, уровень боли по ВАШ	5, 7, 18, 30, 90-е сутки после травмы		
МСКТ	–	5, 7, 30, 90-е сутки после травмы	
Денситометрия	–	При поступлении (5-е сутки после травмы)	
Иммунологические и биохимические	При включении в исследование	5, 7, 18-е сутки после травмы	
Определение костных маркеров в сыворотке	При включении в исследование	7, 30, 90-е сутки после травмы	
Примечание – ВАШ – визуально-аналоговая шкала; МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография.			

Применение озонотерапии в комплексном лечении ИПБК. Малая аутогемоозонотерапия (МАГОТ) проводилась начиная со вторых суток после оперативного лечения ИПБК. Озоно-кислородная смесь (ОКС) получена на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона УОТА-60-01 «Медозон» (ООО «Медозон», Москва, регистрационное удостоверение № 292/0699/96-5-27). Технология проведения процедуры МАГОТ: концентрация озона в озоно-кислородной смеси составляла 20 мг/л, в резервуар шприца для внутримышечных инъекций набирали 10 мл ОКС. Из кубитальной вены в тот же шприц, предварительно заполненный ОКС, набирали венозную кровь в объеме 10 мл. Смешивание ОКС и венозной крови производили в резервуаре шприца, аккуратно перемешивая путем плавного покачивания в течение 3–5 секунд, затем озонированную кровь и оставшийся в резервуаре объем ОКС вводили глубоко

внутримышечно в ягодичную или бедренную область. Курс составил 7 процедур, проводимых через день. Побочных эффектов после проведения МАГОТ не зарегистрировано ни в одном случае.

В таблице 2 представлены методы исследования, используемые в работе.

Таблица 2 – Методы исследования, использованные в работе

Клинические методы	
- Оценка интенсивности боли - оценка консолидации перелома	- Визуально-аналоговая шкала (ВАШ) (Huskisson E. C., 1974) - Шкала RUST (Kooistra B. W. et al., 2010; Leow J. M., 2016)
Инструментальные методы	
- Оценка МПК (ед. Хаунсфилда)	- МСКТ на компьютерном томографе GE Healthcare Light Speed VCT64 (США)
Биохимические методы	
Продукты окислительной модификации липидов	- Экстракционно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО-Спектр», Санкт-Петербург) по методике И. А. Волчегорского и соавт. (Волчегорский И. А. и соавт., 1989; 2000; Львовская Е. И. и соавт., 1991). В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оптическую плотность при 220 нм (содержание изолированных двойных связей), 232 нм (содержание диеновых конъюгатов – ДК), 278 нм (содержание кетодиенов и сопряженных триенов – КД и СТ), 400 нм (основания Шиффа – ШО). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е. и. о.): E_{232}/E_{220} (ДК), E_{278}/E_{220} (КД и СТ) и E_{400}/E_{220} (ШО)
Продукты окислительной модификации белков (ОМБ)	- По реакции Фентона в спонтанном и металл-индуцируемом режимах с последующей регистрацией на спектрофотометре альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) в ультрафиолетовой части спектра и области видимого света (Фомина М. А. и соавт., 2014). Результат выражали в единицах оптической плотности на мг белка (у. е. / мг). Резервно-адаптационный потенциал (РАП, %) рассчитывали как отношение результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному по реакции Фентона, принимая результаты измерения индуцированного за 100 %
Иммунологические методы	
Оценка функциональной активности моноцитов крови	- Спектрофотометрическая оценка адгезии в относительных единицах флуоресценции (о. е. ф.) (Маянский А. Н., 1993) - Оценка бактерицидности согласно спонтанному и индуцированному МТТ-тесту (Berridge M. V., 2005), в о. е. ф. - Оценка пролиферативной активности моноцитов с использованием витального красителя AlamarBlue® («Invitrogen», США) на флуориметре VersaFluor («Bio-Rad», США), в о. е. ф. (Петренко Ю. А., 2005)
Определение функциональной активности нейтрофилов	- Оценка поглотительной способности нейтрофилов крови (активность, % клеток), интенсивность фагоцитоза (у. е.), фагоцитарное число (у. е.) - Оценка кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови (спонтанный и индуцированный НСТ-тест): активность (% клеток), интенсивность (у. е.) (Маянский М. Е. и соавт., 1993)
Определение концентрации цитокинов, маркеров	- Методом твердофазного ИФА: IL-6 (пг/мл), IL-4 (пг/мл) с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск); С-концевые телопептиды коллагена (bCTx, пг/мл) и С-концевые пропептиды проколлагена (PICP, нг/мл) тест-системами Cloud-Clone.Corp. (Китай). Учет результатов

метаболизма костной ткани в сыворотке	производили на планшетном спектрофотометре MultiscanPlus (Labsystems, Финляндия) при соответствующей длине волны
---------------------------------------	--

Окончание таблицы 2

Количественное определение клеток крови	- На гематологическом анализаторе Coulter LH 500 (Beckman Coulter, США) с применением калибровочных частиц Flow-Count Fluorespheres (Beckman Coulter, США)
Количественное определение популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов	- На лазерном проточном цитометре FACS Canto 10 (Becton Dickinson, США) с использованием гомогенного гейтирования по показателям светорассеяния, в $\cdot 10^9/\text{л}$. Определение CD95 ⁺ -лимфоцитов на цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США); полученные данные анализировали в рамках программы Cell Quest, в $\cdot 10^6/\text{л}$
Оценка апоптоза и пролиферации лимфоцитов	- На цитометре FACS Canto 10 (Becton Dickinson, США) при окраске лимфоцитов пропидиум йодидом, в $\cdot 10^6/\text{л}$
Определение экспрессии маркеров клеточного обновления (Bcl-2)	- На цитометре FACS Canto 10 (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител (анти-Bcl-2, меченных FITC) линии Caltag (Caltag Laboratories, США), в $\cdot 10^6/\text{л}$

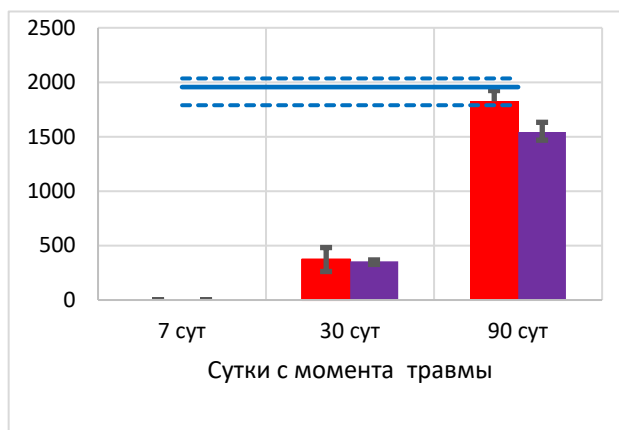
Статистические методы исследования. Результаты обрабатывали с использованием лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19. Данные представлены в виде Me (Q_{25} ; Q_{75}), где Me – медиана, Q_{25} , Q_{75} – значения нижнего и верхнего квартилей соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса). С целью выявления связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). С учетом поправки Бонферрони отличия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,02$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

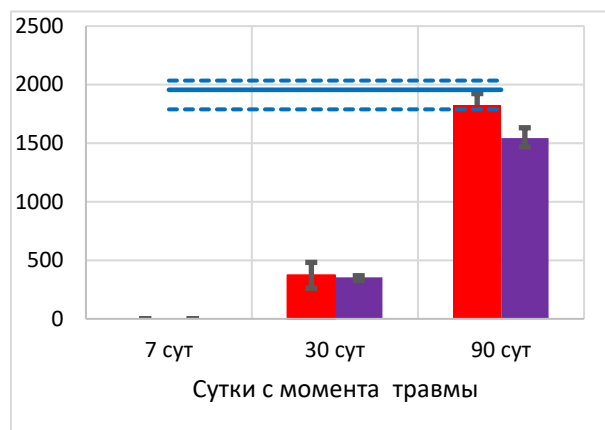
Пациенты с ИПБК на 7-е сутки продемонстрировали полное отсутствие формирования костной мозоли. 30-е сутки характеризовались появлением КТ-признаков периостальной костной мозоли, МПК в сравнении с кортикальным слоем контрлатеральной здоровой конечности составила в группе 2 по медиане 18,2 %, по шкале RUST – 6,5 (5,5; 7,0) балла. На 90-е сутки на КТ показатель МПК формируемой периостальной мозоли приближался к показателю кортикального слоя здоровой конечности и составлял по медиане 78,2 %, степень консолидации перелома по шкале RUST – 10 (9,0; 11,0) балла, что отражает частичное сращение перелома. Зона перелома на протяжении всего периода ремоделирования подвергается резорбции локальных участков при одновременном заполнении дефектов новообразованной костной тканью. Концентрация bCTx повышалась в сыворотке пациентов уже на 7-е сутки после ИПБК с нарастанием на последующих этапах исследования (30-е, 90-е сутки), в то время как

концентрация в сыворотке РСР I типа значительно повышалась начиная с 30-х суток в сравнении со здоровыми лицами (рисунок 1).

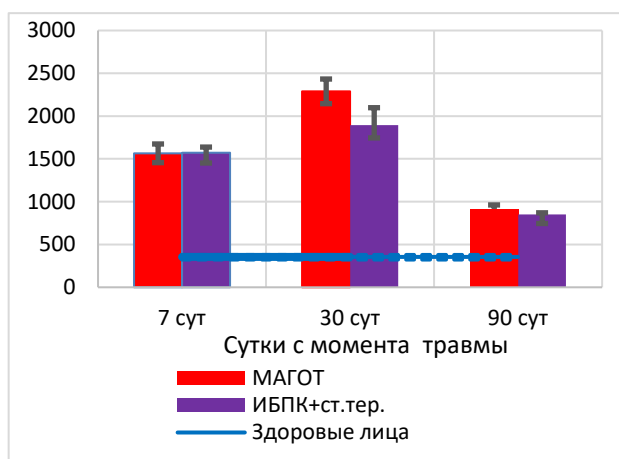
Шкала RUST, баллы



МПК, ед. Хаунсфилда



бСТх, пг/мл



РСР, нг/мл

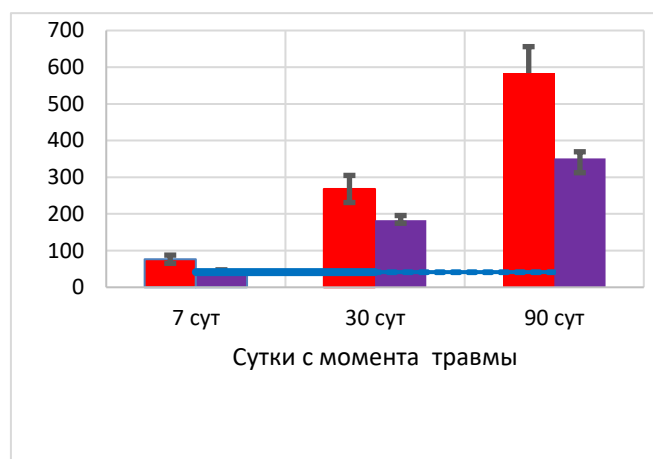


Рисунок 1 – Клинико-инструментальные показатели и маркеры метаболизма костной ткани при ИПБК на фоне МАГОТ [Me (Q₂₅; Q₇₅)]

Локальные иммунные реакции включают накопление в области повреждения полиморфно-ядерных нейтрофилов, функция которых заключается в очищении раны; активацию резидентных макрофагов, миграцию в очаг лимфоцитов, секретирующих провоспалительные цитокины, медиаторы воспаления, что обеспечивает смену воспалительной фазы на репаративную (Huang C. et al., 2014; Schlundt C. et al., 2015; Loi F. et al., 2016; Gibon E. et al., 2017; Lu L. Y. et al., 2017). Нами при ИПБК установлено увеличение в крови количества лейкоцитов за счет палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на 5-е и 7-е сутки, что свидетельствует о мобилизации лейкоцитов из костного мозга в ответ на травму и оперативное вмешательство, с нормализацией уровня последних к 18-м суткам. В то же время количество лимфоцитов и моноцитов в крови возрастала к 18-м суткам наблюдения, что может указывать на завершение воспалительных реакции в ране и отражать необходимость участия мононуклеаров в реализации этапов репаративной регенерации (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние МАГОТ на показатели иммунного статуса в крови при ИПБК (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Здоровые, n = 30	Группа 2 ИПБК, n = 35			Группа 3 ИПБК + МАГОТ, n = 35	
		5-е сутки	7-е сутки	18-е сутки	7-е сутки	18-е сутки
Сегментоядерные нейтрофилы, •10 ⁹ /л	2,7 (2,5; 3,2)	5,8 (5,2; 6,3) *	5,8 (5,5; 5,8) *	2,6 (2,5; 3,0) #, §	5,9 (5,6; 5,9)	2,7 (2,3; 3,4)
Палочкоядерные нейтрофилы, •10 ⁹ /л	0,2 (0,2; 0,4)	0,6 (0,4; 0,9) *	0,7 (0,5; 0,9) *	0,3 (0,2; 0,4) #, §	0,7 (0,5; 0,9) *	0,3 (0,2; 0,4)
Лимфоциты, •10 ⁹ /л	2,8 (2,3; 3,0)	2,9 (2,3; 3,1)	3,1 (2,9; 3,2)	4,6 (3,2; 5,9) *, #, §	3,0 (2,7; 3,1)	3,0 (2,8; 3,4) **
Спонтанная МТТ-активность лимфоцитов, у. е.	0,1 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,2)	0,2 (0,2; 0,3) *, #, §	0,2 (0,2; 0,3)	0,4 (0,3; 0,4) *, **
Индукцированная МТТ-активность лимфоцитов, у. е.	0,4 (0,3; 0,4)	0,3 (0,3; 0,4)	0,3 (0,3; 0,3)	0,4 (0,4; 0,5) *, #, §	0,28 (0,26; 0,29)	0,5 (0,4; 0,5) *, **
НСТ-тест сп., активность, %	17,8 (17,0; 18,0)	21,3 (21,0; 24,0) *	22,7 (20,0; 29,3) *	18,0 (15,0; 19,2) §, #	22,9 (21,1; 28,4)	22,3 (21,7; 25,4) *, **
НСТ-тест сп., интенсивность, у. е.	0,2 (0,2; 0,2)	0,3 (0,2; 0,3) *	0,3 (0,2; 0,4) *	0,2 (0,2; 0,2) §, #	0,3 (0,2; 0,4)	0,4 (0,3; 0,4) *, **
IL-6, пг/мл	1,8 (0,6; 1,9)	156,3 (123,5; 178,4) *	154,8 (135,6; 182,2) *	149 (128,7; 154,9) *	155,1 (136,1; 180,1) *	98 (83,2; 112,4) *, **
IL-4, пг/мл	2,3 (0,1; 3,1)	5,8 (3,6; 6,9) *	9,3 (9,1; 10,6) *	58,9 (42,5; 62,9) *, #, §	9,6 (9,2; 10,4)	56,6 (45,3; 64,3) *
T-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻), •10 ⁹ /л	2,5 (2,2; 3,2)	2,6 (2,3; 2,8)	2,7 (2,4; 3,2)	4,0 (3,8; 4,2) *, #, §	2,6 (2,3; 3,1)	2,8 (2,5; 3,1) **
T-регуляторные лимфоциты (CD45R0 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻), •10 ⁹ /л	0,4 (0,4; 0,5)	0,8 (0,7; 0,9) *	0,8 (0,6; 0,9) *	0,9 (0,8; 1,1) *	0,8 (0,6; 0,9) *	0,5 (0,4; 0,6) **
CD3 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоциты, •10 ⁹ /л	0,2 (0,2; 0,2)	0,3 (0,3; 0,3) *	0,4 (0,4; 0,5) *	0,4 (0,4; 0,5) *	0,5 (0,4; 0,5) *	0,2 (0,2; 0,3) **
CD3 ⁺ HLA ⁺ , •10 ⁹ /л	0,2 (0,2; 0,2)	0,2 (0,2; 0,3)	0,6 (0,5; 0,8) *	0,8 (0,7; 0,9) *	0,6 (0,5; 0,8) *	0,3 (0,2; 0,3) **
Апоптоз (гиподиплоидный пик), •10 ⁶ /л	7,0 (2,0; 10,0)	14,0 (10,0; 18,0) *	16,0 (10,0; 19,0) *	11,0 (10,0; 15,0) *	17,0 (11,0; 18,0) *	5,0 (2,0; 7,0) **
CD3 ⁺ Vс1-2 лимфоциты, •10 ⁶ /л	12,3 (11,2; 13,4)	8,0 (7,5; 8,6) *	4,5 (3,6; 5,6) *, §	5,7 (4,2; 6,6) *, §	4,7 (3,9; 5,5) *	12,1 (9,6; 13,2) **

Примечание – * – значимые (p < 0,02) различия с группой 1; § – с 5-ми сутками в группе 2; # – с 7-ми сутками в группе 2; ** – с соответствующим показателем группы 2 на 18-е сутки.

Изменения функциональной активности фагоцитов на протяжении всего посттравматического периода, связанные с реализацией резорбтивно-репаративных процессов и своевременной сменой этапов воспалительного процесса, заключались в увеличении адгезивной, пролиферативной, МТТ-редуцирующей активности моноцитов крови, зафиксированной на 18-е сутки от момента травмы. Нами установлено значимое увеличение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов крови на 5-е и 7-е сутки как следствие происходящих в очаге повреждения событий. Изучение кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови показало повышение спонтанной и индуцированной НСТ-редуцирующей способности на 5-е и 7-е сутки после травмы, что свидетельствует о высокой напряженности эффекторных механизмов врожденного иммунитета (таблица 3).

Провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, TNF- α и др.), обладающие проостеокластогенной активностью, оказывают как прямой стимулирующий эффект на процессы резорбции костной ткани, так и опосредованный через индукцию RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), направляющего терминальную дифференцировку прекурсоров остеокластов и стимулирующего резорбтивную активность зрелых остеокластов. Нами выявлена высокая концентрация в сыворотке IL-6 у пациентов с ИПБК при поступлении (5-е сутки после травмы), на 7-е сутки (после оперативного вмешательства) и на 18-е сутки. В динамике наблюдений после травматического повреждения бедренной кости концентрация в сыворотке противовоспалительного цитокина IL-4 оказалась значимо высокой на 5-е, 7-е, 18-е сутки, прирост показателя был более плавным и достигал максимальных значений на 18-е сутки, что отражает постепенную смену цитокинового профиля на противовоспалительный. IL-4 индуцирует хемотаксис и пролиферацию остеобластов посредством индукции синтеза костного морфогенетического белка (BMP-2), являющегося многофункциональным ростовым фактором для остеобластов, хондробластов, нервных и эпителиальных клеток.

В контексте рассматриваемой проблемы закономерным изменениям подверглись и адаптивные реакции иммунного реагирования. Пятые сутки после ИПБК характеризовались снижением количества в крови НК-лимфоцитов, что, вероятно, предотвращает раннюю высокую цитолитическую активность последних, препятствуя массивному повреждению тканей; отмечено повышение в кровотоке общего количества лимфоцитов и Т-лимфоцитов с маркерами ранней позитивной активации (CD25⁺), что в целом отражает эскалацию активационных процессов в Т-лимфоцитах; повышение абсолютного количества в крови Т-регуляторных клеток, выполняющих надзорную функцию за Т-клеточным гомеостазом, способствует формированию иммуносупрессивного фона при травме, предупреждает явления «цитокинового шторма» (Albertsmeier M. et al., 2015; Serve R. et al., 2018). Другие исследователи также указывают на повышение в крови после

травмы количества Т-лимфоцитов, в том числе в связи с Treg-опосредованной сменой фенотипа от Th1 к Th2 (Marik P. E. et al., 2012). На 7-е и 18-е сутки после ИПБК отмечалось значимое повышение в крови общего количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-регуляторных клеток; увеличение количества Т-лимфоцитов с маркерами ранней (CD25⁺) и поздней (HLA-DR⁺) позитивной активации, отражающих интенсивность презентации неоантигенов формируемой костной ткани при репарации.

Исследования доказали регуляторную роль активированных Т-лимфоцитов в реализации остеокластогенной активности за счет секреции интермедиата SOFAT (секретируемый остеокластогенный фактор активированных Т-лимфоцитов), усиливающего продукцию IL-6 остеобластами и функциональную активность остеокластов (Коршунова Е. Ю. и соавт., 2012). На 5-е и 7-е сутки зафиксированы однотипные изменения апоптоза лимфоцитов в виде увеличения количества в крови клеток с признаками апоптоза, вероятно, за счет реализации Fas-зависимого механизма, учитывая повышение количества Т-лимфоцитов с экспрессией CD95⁺, снижение количества Т-лимфоцитов с экспрессией антиапоптогенного белка Bcl-2. Повышение гибели лимфоцитов в ранний посттравматический период, вероятно, обусловлено также запуском кортизол-индуцированного апоптоза лимфоцитов на фоне стресса (Киселева Н. М. и соавт., 2012). На 18-е сутки в крови сохранялось повышение количества лимфоцитов с признаками апоптоза, в том числе за счет лимфоцитов с экспрессией CD95⁺, на фоне высоких темпов пролиферации. Количество в крови Т-лимфоцитов, экспрессирующих ингибитор апоптоза Bcl-2, оставалось значимо ниже по сравнению с группой 1.

Мобилизация воспалительных клеток (нейтрофилов, моноцитов) в очаг повреждения, их последующая активация сопровождаются изменением баланса про- и антиоксидантных систем, приводят к аккумуляции продуктов свободнорадикального окисления, обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью; модификации структуры липидов, белков и нуклеопротеидов (Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006; Кошоридзе Н. И. и соавт., 2010). Установленные нами изменения редокс-статуса при ИПБК заключались в накоплении в гептановой фазе липидного экстракта плазмы, концентрирующей большую часть резервных липидов (триацилглицеридов), первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ: соответственно, диеновых конъюгатов ацилгидроперекисей и кетодиенов и сопряженных триенов, а также оснований Шиффа, выраженных в единицах оптической плотности и в единицах индексов окисления, начиная с 5-х суток. На 18-е сутки значимого снижения показателей в сравнении с группой 1 нами не зафиксировано. В изопропанольной фазе липидов плазмы, аккумулирующих в основном мембранные фосфолипиды, отмечено (также начиная с 5-х суток) увеличение содержания вторичных и конечных продуктов ПОЛ в абсолютных величинах и индексах окисления. Травматическое повреждение бедренной кости сопровождается повышением уровня АДНФГ

и КДНФГ, определяемых как в области УФ-света, так и в области видимого света, в плазме на 5-е, 7-е и 18-е сутки после травмы, с параллельным повышением суммарного относительного и абсолютного количества карбонильных производных белков основного и нейтрального характера (АДНФГ и КДНФГ), являющихся необратимыми ранними и поздними маркерами окислительного стресса соответственно. Показатели окислительной модификации белков в металл-катализируемом режиме продемонстрировали на 5-е, 7-е и 18-е сутки значимое повышение суммарного содержания АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых в области видимого и ультрафиолетового спектра, и снижение резервно-адаптационного потенциала на 18-е сутки за счет нарастания уровня КДНФГ в плазме (таблица 4).

Анализ корреляционной матрицы показал наличие значимых связей между показателями, определенными на 7-е сутки после ИПБК: между концентрацией bСТх и показателями врожденного иммунитета – количеством лейкоцитов, пролиферативной и спонтанной и индуцированной МТТ-активностью моноцитов, активностью фагоцитоза, показателями спонтанной НСТ-редуцирующей активности и интенсивности нейтрофилов, про- и противовоспалительными цитокинами (рисунок 2). Все связи положительные, из них 2 сильные, 5 средних, 1 слабая связь; отражают прямую зависимость между функциональным состоянием эффекторов врожденного иммунитета: нейтрофилов и макрофагов и интенсивностью процессов резорбции костного детрита, осуществляемого остеокластами. Известна проостеокластогенная роль IL-6, что подтверждает зафиксированная нами сильная прямая связь между IL-6 и bСТх. Средней силы ассоциации между IL-4 и bСТх отражают регуляторное воздействие противовоспалительного цитокина на активность остеобластов, стимуляцию хемотаксиса последних.

Ассоциации между концентрацией в сыворотке bСТх и показателями адаптивного иммунитета включают: прямые, средней силы связи с количеством в крови Т-регуляторных лимфоцитов, Т-лимфоцитов с маркерами ранней активации, отрицательную связь с количеством Т-лимфоцитов, экспрессирующих антиапоптогенный Vcl-2. Данные связи могут указывать на участие эффекторов адаптивного иммунитета в процессах резорбции костной ткани при ИПБК. Проведенный анализ позволяет предположить, что на 7-е сутки после ИПБК повышение показателей окислительной деструкции липидов и белков в плазме ассоциировано с интенсивностью резорбтивных процессов в костной ране.

Между PISR и параметрами врожденного, адаптивного иммунитета и редокс-статуса зафиксировано 16 значимых связей, среди которых 5 (1 – сильная прямая, 4 – положительные, средней силы) – с показателями врожденного иммунитета: пролиферативной, спонтанной и индуцированной МТТ-активностью моноцитов, концентрацией в сыворотке про- и противовоспалительных цитокинов. Данные ассоциации отражают активное участие клеток моноцитарной линии в процессах ремоделирования костной ткани.

Таблица 4 – Влияние МАГОТ на показатели окислительной деструкции липидов и белков в плазме при ИПБК (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Здоровые, n=30	Группа 2 ИПБК, n=35			Группа 3 ИПБК + МАГОТ, n=35	
		5-е сутки	7-е сутки	18-е сутки	7-е сутки	18-е сутки
ДК (гептановая фаза), е. и. о.	0,2 (0,2; 0,3)	0,8 (0,7; 0,8) *	0,8 (0,7; 0,9) *	0,8 (0,7; 0,8) *	0,8 (0,7; 0,9) *	0,2 (0,2; 0,3) **
КД и СТ (гептановая фаза), е. и. о.	0,1 (0,1; 0,1)	0,2 (0,1; 0,2) *	0,2 (0,1; 0,2) *	0,2 (0,1; 0,2) *	0,2 (0,1; 0,2) *	0,1 (0,01; 0,1) **
ШО (гептановая фаза), е. и. о.	0,01 (0,001; 0,01)	0,1 (0,02; 0,1) *	0,1 (0,1; 0,1) *	0,1 (0,1; 0,1) *	0,1 (0,1; 0,1) *	0,02 (0,01; 0,03) **
ДК (изопропанольная фаза), е. и. о.	0,5 (0,3; 0,6)	0,5 (0,5; 0,7)	0,5 (0,4; 0,5)	0,5 (0,4; 0,5)	0,5 (0,4; 0,5)	0,5 (0,5; 0,6)
КД и СТ (изопропанольная фаза), е. и. о.	0,1 (0,02; 0,1)	0,2 (0,2; 0,3) *	0,3 (0,2; 0,3) *	0,3 (0,2; 0,3) *	0,3 (0,2; 0,3)	0,1 (0,1; 0,2) **
ШО (изопропанольная фаза), е. и. о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,04 (0,02; 0,1) *	0,1 (0,1; 0,1) *	0,1 (0,04; 0,1) *	0,1 (0,04; 0,1)	0,02 (0,01; 0,03) **
S ОМБ общ. спонт., у. е. / мг белка	27,5 (26,7; 28,1)	36,4 (29,8; 43,9) *	38,2 (26,3; 40,4) *	40,1 (27,4; 42,1) *	39,2 (27,3; 41,2)	29,5 (27,2; 30,8) **
S _{аднфг} , у. е. / мг белка	25,9 (25,4; 26,4)	32,3 (26,9; 38,6) *	34,2 (29,2; 38,6) *	32,1 (28,5; 36,4) *	35,1 (28,3; 37,9)	26,3 (25,5; 27,8) **
S _{кднфг} , у. е. / мг белка	1,6 (1,4; 1,7)	4,1 (2,5; 5,6) *	3,6 (2,5; 5,8) *	4,2 (3,9; 5,1) *	3,7 (2,7; 5,9)	1,7 (1,4; 1,7) **
S _{ув} , у. е. / мг белка	26,6 (22,3; 28,6)	34,2 (30,2; 36,4) *	31,6 (29,4; 32,4) *	30,2 (28,4; 32,2) *	32,3 (28,6; 32,5)	27,1 (26,3; 28,2) **
S _{vs} , у. е. / мг белка	1,2 (1,1; 1,3)	3,2 (3,0; 3,3) *	3,3 (3,0; 3,4) *	3,7 (3,5; 3,9) *	3,3 (3,0; 3,5)	1,4 (1,2; 1,8) *
S _{кднфг} , у. е. (МКО)	3,7 (3,6; 3,8)	12,1 (10,2; 14,4) *	9,6 (4,6; 10,2) *	12,3 (8,8; 12,6) *	9,4 (5,3; 10,2) *	5,4 (4,1; 5,9) **
S _{ув} , у. е. / мг белка (МКО)	38,1 (36,2; 39,4)	61,1 (58,3; 62,5) *	61,9 (58,4; 62,3) *	64,1 (62,3; 65,2) *	61,2 (57,6; 61,3)	39,2 (36,2; 40,4) **
S _{vs} , у. е. / мг белка (МКО)	2,3 (1,9; 2,5)	10,2 (9,3; 10,8) *	9,8 (9,2; 10,2) *	10,05 (9,5; 11,0) *	9,7 (9,3; 10,5)	2,5 (2,3; 2,7) **
S ОМБ общ., у. е. / мг белка (МКО)	48,5 (42,9; 54,5)	71,5 (56,4; 73,1) *	68,2 (58,3; 72,1) *	64,6 (46,3; 71,3) *	67,9 (59,3; 70,3)	49,2 (46,9; 54,4) **
РАП, %	43,3 (42,1; 46,6)	46,1 (43,6; 47,8)	43,9 (42,3; 46,8)	34,9 (32,5; 38,5) *, §, #	44,2 (42,5; 46,4)	43,2 (42,5; 46,1) **

Примечание – * – значимые различия (p<0,02) с группой 1; § – с 5-ми сутками в группе 2; # – с 7-ми сутками в группе 2; ** – с соответствующим показателем группы 2 на 18-е сутки.

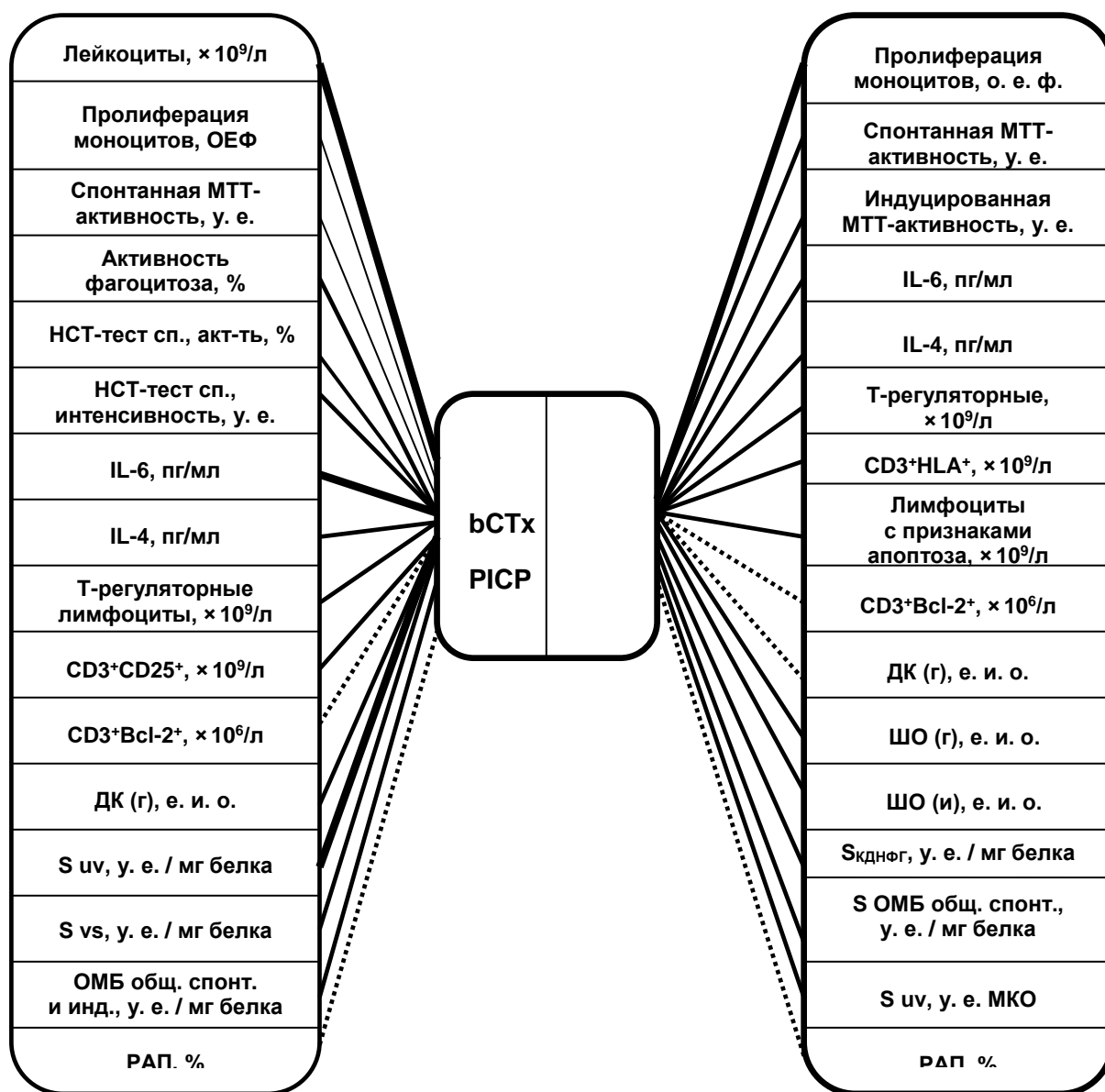


Рисунок 2 – Корреляция между маркерами метаболизма костной ткани, показателями иммунного и редокс-статуса при ИПБК на 7-е сутки (толщина линий отражает силу связей: сплошные линии – прямые связи, пунктирные – обратные)

С показателями адаптивного иммунитета установлены 3 средней силы прямые связи: с количеством Т-регуляторных лимфоцитов, Т-лимфоцитов с маркерами поздней позитивной активации, лимфоцитов с признаками апоптоза; одна отрицательная сильная связь – с количеством лимфоцитов, экспрессирующих Vcl-2. Процесс ремоделирования костной ткани сопровождается изменением антигенного репертуара новообразованных тканей, о чем свидетельствуют ассоциации маркера репарации и Т-лимфоцитов, экспрессирующих антигены системы HLA-DR, способных к антигенной презентации. Выявлены значимые ассоциации между PICP и показателями редокс-статуса плазмы, характеризующими окислительную деструкцию липидов и белков, резервно-адаптационный

потенциал: 5 прямых средней силы связей, 2 отрицательных, средней и слабой силы.

Таким образом, проведенный корреляционный анализ показал наличие сильных и средней силы, преимущественно прямых, связей между маркерами метаболизма костной ткани, параметрами врожденного и адаптивного иммунитета и редокс-статуса плазмы крови, что свидетельствует о взаимном влиянии изучаемых показателей иммунитета и редокс-статуса, их участии в ремоделировании костной ткани при ИПБК. Некоторые уточненные аспекты патогенеза изолированного перелома бедренной кости представлены на интегральной схеме (рисунок 2).

Применение МАГОТ в комплексном лечении неосложненного ИПБК позволило зафиксировать ряд положительных эффектов, влияющих на результаты лечения данной патологии за счет мультимодальных свойств молекулярных дериватов озона. На фоне МАГОТ показатель интенсивности болевых ощущений, регистрируемый по ВАШ, значимо снижался на 18-е сутки относительно аналогичного показателя, зафиксированного в группе 2. Обезболивающий эффект озонотерапии связан с окислительной модификацией медиаторов воспаления, продуктов распада белковых молекул (алгопептидов), участвующих в передаче ноцицептивного сигнала в ЦНС (Торгашин А. Н. и соавт., 2019).

На 30-е сутки наблюдения, то есть через 14–15 дней после завершения курса МАГОТ, на КТ зарегистрирован четко определяемый периостальный регенерат костной мозоли, общий балл по шкале консолидации перелома RUST составил 8,7 (5,9; 8,9) и значимо отличался от аналогичного показателя в группе 2, получающей стандартную терапию. МПК в сравнении с кортикальным слоем контрлатеральной здоровой конечности составила по медиане 19,4% (рисунок 1). 90-е сутки наблюдения характеризовались полным отсутствием болевого синдрома при осевой, боковых и ротационных нагрузках на конечность и отсутствием патологической подвижности в зоне перелома. Плотность костной ткани составила по медиане 90,4%, была сравнима с уровнем МПК здоровой конечности и значимо превышала данный показатель в группе 2, что свидетельствует о более высокой скорости ремоделирования костного регенерата, качестве формируемой костной мозоли. Общий балл по шкале RUST составил 11,5 (10,5; 12,0) и значимо превышал аналогичный показатель в группе 2, что подтверждает полное сращение перелома. В результате проведенного лечения с применением МАГОТ средний показатель сроков консолидации перелома бедренной кости составил 85,7 (82,6; 98,6) дня, в группе сравнения – 125,4 (110,5; 137,4) дня ($p < 0,02$).

Большинство процессов, связанных с регулирующей деятельностью иммунной системы, направлено на резорбцию костной ткани; ключевую роль в этом играют цитокины, относящиеся к системе рецептора активатора ядерного

фактора каппа- β (RANK), его лиганда (RANKL) и остеопротегерина (OPG). В группе 3, получающей МАГОТ, концентрация bCTx на 30-е сутки была значимо выше относительно значений группы 2, что, вероятно, отражает более высокие темпы резорбции на фоне МАГОТ, а показатель репарации PCIP уже начиная с 7-х суток, а также на 30-е и 90-е сутки был значимо выше в сравнении с группой 2, что в целом находит отражение в увеличении скорости ремоделирования костного регенерата и сокращении сроков консолидации неосложненного изолированного перелома бедренной кости.

Техника проведения процедуры МАГОТ предполагает смешивание озонкислородной смеси и венозной аутокрови в резервуаре шприца, что приводит к прямому взаимодействию озона с ненасыщенными жирными кислотами мембран клеток крови, а также компонентами плазмы с образованием продуктов озонлиза: альдегидов, гидропероксидов (перекись озона) и последующей трансформацией в H_2O_2 и альдегид-4-гидроксиноненаль (4-HNE), который является одним из наиболее активных реактогенных альдегидов (Vocci V. et al., 2005, 2015; Orakdogan M. et al., 2016). Биорегуляторный эффект озонотерапии в отношении функциональной активности моноцитов и нейтрофилов крови при ИПБК проявлялся в виде значимого повышения спонтанной и индуцированной МТТ-активности моноцитов, спонтанной НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови на 18-е сутки, что может быть связано с активацией озоном и его дериватами кислород-зависимых процессов в клетках (таблица 3).

Анализ гемограмм на 18-е сутки после ИПБК, то есть сразу после завершения курса МАГОТ, продемонстрировал значимое увеличение в крови количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита в сравнении с группой 2 – пациентов, находящихся на стандартной терапии. При проведении МАГОТ целевыми мишенями, чувствительными к действию молекулы озона, оказываются клеточные мембраны форменных элементов крови (эритроцитов, лимфоцитов, тромбоцитов), клеток эндотелия, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, ароматические аминокислоты и пептиды с наличием SH-групп, а также плазменные пептидные метаболиты. Повышение в крови количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита может быть связано с влиянием продуктов озонлиза на внутриклеточный репрессорный белок Keap1, с которым тесно связан Nrf2 (редокс-чувствительный эритроидный ядерный транскрипционный фактор), регулирующий активность генов, отвечающих за метаболизм железа и гема (Ткачев В. О., 2011; 2017; Orakdogan M. et al., 2016). Озонолиз ненасыщенных жирных кислот мембран эритроцитов сопровождается образованием перекисей, оказывающих стимулирующее действие на внутриклеточный эритроцитарный метаболизм (Ковальчук Е. А., 2007; Rowen R. J. et al., 2019). Озонолиз ПНЖК мембраны эритроцита индуцирует каскад реакций, приводящих к повышению концентрации 2,3-дифосфоглицерата, что облегчает отдачу кислорода из окисленного

гемоглобина недостаточно кровоснабжаемым тканям зоны перелома и необходимо для поддержания адекватной репарации костной ткани (Rowen R. J. et al., 2019). Известно, что озон активно вмешивается в метаболизм клеток, повышая эффективность работы дыхательной цепи митохондрий, увеличивая скорость гликолиза за счет повышения активности фосфофруктокиназы, увеличивает синтез АТФ, индуцирует синтез оксида азота (II), простаглицлина, что повышает резистентность тканей к гипоксии, увеличивает площадь перфузии, тем самым способствуя коррекции микроциркуляторных расстройств в зоне перелома (Ковальчук Е. А., 2007; Orakdogan M. et al., 2016; Smith N. L. et al., 2017; Schwartz A., Sánchez G., 2019).

На фоне МАГОТ значительно снизилась концентрация в сыворотке ИЛ-6, возможно, за счет озонопосредованной супрессии ядерного фактора транскрипции NF-κB. Снижение интенсивности остеокластогенеза может также происходить под действием оппозитного противовоспалительного ИЛ-4, относящегося к кластеру «ингибиторных» цитокинов, ослабляющих процессы костной резорбции за счет подавления пролиферации и дифференцировки прекурсоров остеокластов. Применение МАГОТ не влияло на концентрацию ИЛ-4 в сыворотке, которая на 18-е сутки оставалась на значимо высоком уровне в сравнении со здоровыми лицами (таблица 3).

Изучение популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов крови на фоне МАГОТ продемонстрировало значимое снижение до показателей здоровых лиц общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-регуляторных клеток и Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней позитивной активации относительно аналогичных значений группы 2 – пациентов, находящихся на стандартной терапии. На фоне МАГОТ на 18-е сутки значительно снизилось количество Т-регуляторных клеток, что может способствовать ограничению механизмов Т-зависимой иммуносупрессии, необходимой на ранних сроках после ИПБК, для предупреждения избыточной активации иммунной системы. На фоне МАГОТ установлено значимое снижение до показателей здоровых лиц количества в крови лимфоцитов с признаками апоптоза и Т-лимфоцитов с экспрессией CD95⁺ на фоне увеличения количества лимфоцитов, экспрессирующих антиапоптогенный фактор Bcl-2, что отражает наличие протективного действия озона на выживаемость Т-лимфоцитов и в целом регулирует численность общей популяции Т-лимфоцитов. Антиапоптогенное действие озона опосредовано влиянием на редокс-чувствительный эритроидный ядерный транскрипционный фактор Nrf2, регулирующий активность антиапоптогенных Bcl-2 и Bcl-x генов (Ткачев В. О., 2011; 2017). При экспериментальном моделировании гипоксии головного мозга доказано ограничивающее действие озона на апоптоз нейронов, обусловленное прямым эффектом на мембранный сфингомиелин (Белоус Ю. А., 2011).

Продемонстрированный нами иммуотропный эффект МАГОТ при ИПБК может быть обусловлен способностью продуктов озонлиза (4-HNE, перекиси озона) проникать в цитоплазму иммунокомпетентных клеток и оказывать модулирующее действие на ядерные транскрипционные факторы: NF-κB, Nrf2 и др. (Bocsi V. et al., 2005; 2015; Orakdogan M. et al., 2016). В отношении продуктов озонлиза описан дозозависимый ограничивающий эффект на активность NF-κB в отношении синтеза IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, TGF-β, PDGF (Orakdogan M. et al., 2016). В то же время озон и его производные могут выступать регуляторами редокс-статуса за счет мобилизации эндогенной антиоксидантной системы клеток. Наши исследования продемонстрировали ПОЛ-ограничивающий эффект МАГОТ в виде снижения количества в плазме первичных, вторичных и конечных продуктов окислительной деструкции липидов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов – в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы, снижения количества АДНФГ и КДНФГ в варианте спонтанной и металл-зависимой оценки продуктов окислительной модификации белка, а также рост резервно-адаптационного потенциала (таблица 4).

Известно, что поступление озона в организм приводит к эскалации умеренного окислительного стресса за счет взаимодействия с ПНЖК и водой, усиления образования АФК, липоперекисей, гидроперекисей, изопропанов, озонидов. Наиболее активен данный процесс в гепатоцитах, эритроцитах, фагоцитирующих иммунных клетках, предположительно – за счет способности к генерации неклассических вторичных мессенджеров, в частности 4-HNE, вторично запускающих адаптивный ответ с активацией антиоксидантных систем в клетке (Bocsi V. et al., 2015). Кроме этого, озоном через активацию в клетках Nrf2 модулируется экспрессия генов ферментов детоксикации, антиоксидантной защиты: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, каталазы, гемоксигеназы-1, НАДФ-квинон-оксидоредуктазы-1 (NQO-1), белков теплового шока (HSP) и др. (Bocsi V. et al., 2005; 2015; Inal M. et al., 2011; Re L. et al., 2014).

Основные установленные нами эффекты озонотерапии представлены на рисунке 3. Таким образом, нами установлены иммуномодулирующий, антигипоксический, противовоспалительный, ограничивающий окислительную деструкцию липидов и белков эффекты озона, доказано его позитивное влияние на репаративные процессы в костной ткани, заключающееся в сокращении сроков консолидации перелома и улучшении качества сформированной костной мозоли, что в целом доказывает эффективность и обосновывает применение МАГОТ в комплексном лечении пациентов с изолированными закрытыми переломами бедренной кости. Ключевые аспекты патогенеза ИПБК и механизмы действия озонотерапии в варианте МАГОТ представлены на интегральной схеме (рисунок 4).



Рисунок 3 – Основные эффекты озонотерапии (Hb – гемоглобин, АОС – антиоксидантная система, КЗМ – кислород-зависимый метаболизм, МЦ – микроциркуляция)



Рисунок 4 – Некоторые аспекты патогенеза и механизма действия МАГОТ при ИПБК по результатам проведенного исследования

ВЫВОДЫ

1. В динамике наблюдений от 7-х к 90-м суткам после изолированного перелома бедренной кости повышение концентрации в сыворотке маркеров резорбции и репарации костной ткани происходит по мере увеличения минеральной плотности кости и консолидации перелома.

2. Изменения иммунного статуса при изолированном переломе бедренной кости включают увеличение количества, поглотительной и НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови, количества, адгезивной, пролиферативной и МТТ-редуцирующей активности моноцитов крови, повышение концентрации в сыворотке IL-6, IL-4, повышение в крови количества лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺, CD45RO⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD95⁺, лимфоцитов с признаками апоптоза и пролиферации, снижение количества CD3⁺, экспрессирующих V α 1-2.

3. При изолированном переломе бедренной кости в плазме накапливаются первичные, вторичные и конечные продукты перекисного окисления липидов в гептановой фазе, вторичные и конечные – в изопропанольной фазе липидного экстракта, а также первичные, вторичные продукты окислительной модификации белков основного и нейтрального характера в спонтанном и металл-катализируемом режимах.

4. При изолированном переломе бедренной кости показатели репарации костной ткани ассоциированы с показателями иммунного статуса и свободнорадикальной деструкции липидов и белков в крови.

5. Применение малой аутогемоозонотерапии при изолированном переломе бедренной кости приводит к повышению концентрации в сыворотке маркеров резорбции и репарации костной ткани, оказывает положительное влияние на ремоделирование костного регенерата и сокращает сроки консолидации перелома.

6. Применение малой аутогемоозонотерапии при изолированном переломе бедренной кости приводит к повышению в крови количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, кислород-зависимого метаболизма моноцитов и нейтрофилов, снижает количество в крови CD3⁺CD4⁺, CD45RO⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD95⁺, лимфоцитов с признаками апоптоза, повышает количество CD3⁺, экспрессирующих V α 1-2.

7. На фоне малой аутогемоозонотерапии при изолированном переломе бедренной кости снижается количество первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов – в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы, первичных, вторичных продуктов окислительной модификации белков основного и нейтрального характера в металл-катализируемом режиме и восстанавливается резервно-адаптационный потенциал.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. Осиков, М. В. Врожденный иммунитет при изолированных переломах бедренной кости / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, К. С. Абрамов // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 1. – URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28540>.
2. Осиков, М. В. Процессы свободнорадикального окисления и перспективные направления коррекции редокс-статуса при изолированных переломах бедренной кости / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, К. С. Абрамов // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 2. – URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28605>.
3. Абрамов, К. С. Сравнительная оценка показателей апоптоза и пролиферации при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии / К. С. Абрамов, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22), № 3. – С. 1085–1088.
4. Абрамов, К. С. Влияние озонотерапии на иммунный статус при изолированных переломах бедренной кости / К. С. Абрамов, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков, С. А. Коченгина // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22), № 2. – С. 127–129.
5. Абрамов, К. С. Показатели функциональной активности моноцитов крови в условиях озонотерапии при изолированных переломах бедренной кости / К. С. Абрамов, Е. В. Давыдова // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22), № 2. – С. 130–132.
6. Абрамов, К. С. Динамика уровня цитокинов при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии / К. С. Абрамов, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков // Российский иммунологический журнал. – 2020. – Т. 23, № 3. – С. 323–328.
7. Осиков, М. В. Роль изменений врожденного иммунитета в репарации костной ткани в динамике после изолированного перелома бедренной кости / К. С. Абрамов, М. В. Осиков, Е. В. Давыдова // Южно-Уральский медицинский журнал. – 2020. – № 2. – С. 39–49.
8. Абрамов, К. С. Динамика изменений показателей свободнорадикального окисления при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии / К. С. Абрамов, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков, О. И. Огнева, А. И. Сеницкий // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65, № 1. – С. 79–85.
9. Осиков, М. В. Маркеры ремоделирования костной ткани при консолидации изолированного перелома бедренной кости в условиях системной озонотерапии / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, К. С. Абрамов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2021. – № 1. – С. 64–70.
10. Осиков, М. В. Влияние системной озонотерапии на активность нейтрофилов и концентрацию цитокинов в крови в динамике изолированного перелома бедренной кости / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, К. С. Абрамов // Южно-Уральский медицинский журнал. – 2021. – № 1. – С. 30–39.
11. Давыдова, Е. В. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови после изолированного перелома бедренной кости в динамике хирургического вмешательства / Е. В. Давыдова, М. В. Осиков, К. С. Абрамов // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 3. – С. 597–604.

Публикации в других изданиях

12. Давыдова, Е. В. Влияние системной озонотерапии на показатели метаболизма костной ткани в динамике изолированного перелома бедренной кости / Е. В. Давыдова, М. В. Осиков, К. С. Абрамов // I Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы»:

сборник материалов / под ред. А. В. Колсанова, Г. П. Котельникова, Т. А. Федориной. – Самара : [б. и.], 2020. – С. 358–361.

13. Абрамов, К. С. Влияние озонотерапии на апоптоз и пролиферацию лимфоцитов при травматическом переломе бедренной кости / К. С. Абрамов, М. В. Осиков, Е. В. Давыдова // Типовые патологические процессы: современные тренды в науке: сборник трудов, посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета / под ред. О. И. Уразовой. – Томск : Печатная мануфактура, 2020. – С. 5–6.

14. Конашов, В. А. Динамика маркеров метаболизма костной ткани при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии / В. А. Конашов, А. Д. Седова, К. С. Абрамов // Актуальные проблемы биомедицины – 2021: материалы XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. – Санкт-Петербург : РИЦ ПСПбГМУ, 2021. – С. 68–69.

Список сокращений и условных обозначений

АДФФГ – альдегид-динитрофенилгидразон
 ВАШ – визуально-аналоговая шкала боли
 ДК – диеновые конъюгаты
 ДНФГ – динитрофенилгидразоны
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
 ИПБК – изолированный перелом бедренной кости
 КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены
 КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразон
 КТ – компьютерная томография
 МАГОТ – малая аутогеомоозонотерапия
 МКО – металл-катализируемый режим
 МПК – минеральная плотность кости
 МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
 МТТ – краситель 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия бромид
 НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
 НСТ – нитросиний тетразолий
 ОКС – озono-кислородная смесь
 ОМБ – окислительная модификация белков
 ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
 ПОЛ – перекисное окисление липидов
 РАП – резервно-адаптационный потенциал
 ЦНС – центральная нервная система
 ШО – основания Шиффа
 бСТх – С-концевые телопептиды коллагена
 IFN – интерферон
 IL – интерлейкин
 PDGF – фактор роста тромбоцитов
 PISP – С-концевые пропептиды проколлагена
 TGF – трансформирующий фактор роста
 TNF- α – фактор некроза опухоли альфа

АБРАМОВ
Кирилл Сергеевич

**РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ
И ИММУННОГО СТАТУСА В РЕПАРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ
ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ ПЕРЕЛОМЕ БЕДРЕННОЙ КОСТИ
В УСЛОВИЯХ ОЗОНОТЕРАПИИ**

3.3.3 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск – 2021

Подписано в печать __. __. 2021. Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Усл. печ. л. ____.
Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman сур.
Печать лазерная. Тираж ____ экз. Заказ № ____.

Отпечатано в