

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТАКТНОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Леонид Борисович РЕЗНИК¹, Константин Юрьевич РОЖКОВ¹,
Герман Григорьевич ДЗЮБА¹, Алексей Алексеевич НОВИКОВ²,
Дарья Александровна ЛЕБЕДЕВА², Дмитрий Викторович КОТОВ¹

¹ ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет Минздрава России
644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

² ГБОУ ВПО Омский государственный технический университет
644050, г. Омск, просп. Мира, 11

Нарушение репаративной регенерации костной ткани при лечении открытых переломов – актуальная проблема. Основным методом лечения открытых переломов, внеочаговый остеосинтез, не решает все проблемы лечения, необходима стимуляция регенерации. Один из методов стимуляции – воздействие низкочастотным ультразвуком. Цель настоящего исследования – улучшение результатов лечения открытых переломов трубчатых костей путем сочетания внеочагового остеосинтеза и низкочастотного ультразвукового воздействия. Материал и методы. Исследование проводилось на беспородных половозрелых собаках, у которых моделировался открытый перелом плечевой кости. Выполнялся остеосинтез аппаратом внешней фиксации, состоящим из 2 стандартных стержней-шурупов и 2 полых стержней-шурупов, фиксируемых в планке аппарата внешней фиксации. Через полые стержни-шурупы осуществлялось ультразвуковое воздействие путем введения волновода ультразвукового аппарата «Ярус-М». Результаты. В основной группе (с ультразвуковым воздействием) консолидация перелома достигнута у всех животных, в контрольной группе – у 28 % животных, вялая консолидация – у 44 %, ложный сустав – у 28 %. Опора на оперированную конечность и отсутствие патологической подвижности статистически значимо раньше определялись у животных основной группы, а оптическая плотность костной мозоли была выше, чем у собак контрольной группы. Также у животных основной группы раньше нормализовались содержание лейкоцитов и активность щелочной фосфатазы в крови, при этом величина последнего показателя в раннем послеоперационном периоде была значимо выше, чем в контроле. Обсуждение. Контактное ультразвуковое воздействие способствует более раннему купированию болевого синдрома, повышению плотности костной мозоли, уменьшает последствия действия неблагоприятных факторов, приводящего к формированию вялой консолидации, ложных суставов. Увеличивается активность остеобластического процесса (повышение активности щелочной фосфатазы). Вывод. Контактное ультразвуковое воздействие в условиях внеочагового чрескостного остеосинтеза улучшает результаты лечения открытых переломов трубчатых костей.

Ключевые слова: открытые переломы, ультразвуковое воздействие, стимуляция остеогенеза.

Нарушение репаративной регенерации костной ткани при лечении открытых переломов является актуальной проблемой [1, 2]. Частота неудовлетворительных результатов лечения таких переломов остается высокой (до 30 %) [4]. Основными факторами нарушения регенерации кости в условиях открытых переломов является повреждение мягких тканей, нарушение трофики мягких

тканей, нарушение трофики кости и попадание инфекционных агентов в место повреждения. Основным методом оперативного лечения открытых переломов длинных трубчатых костей остается чрескостный остеосинтез. Однако изолированное использование аппарата внешней фиксации не решает все проблемы открытого перелома [3]. Наличие двух и более неблагоприятных факто-

Резник Л.Б. – д.м.н., проф., зав. кафедрой травматологии и ортопедии, e-mail: omsktravma@mail.ru

Рожков К.Ю. – аспирант кафедры травматологии и ортопедии, e-mail: kosroj@gmail.com

Дзюба Г.Г. – к.м.н., доцент кафедры травматологии и ортопедии, e-mail: germanort@mail.ru

Новиков А.А. – д.т.н., проф. кафедры машиностроения и материаловедения, секция Материаловедение и технологии конструкционных материалов

Лебедева Д.А. – ассистент кафедры машиностроения и материаловедения, секция Материаловедение и технологии конструкционных материалов

Котов Д.В. – врач-травматолог-ортопед, e-mail: egkin.kot@mail.ru

ров (наличие раны, разможение мягких тканей, дефект костной ткани, инфекция) является показанием для стимуляции репаративного остеогенеза [3]. Стимуляция может осуществляться с помощью различных факторов, в том числе с помощью физических методов воздействия, в частности ультразвука [6–9]. Ультразвуковые колебания, проходя через мягкие ткани, затухают [7]. Поэтому чем больший мягкотканый массив располагается перед костью, тем меньшей интенсивности ультразвуковые колебания доходят до кости и тем меньше эффект ультразвука. Поэтому чем ближе к кости располагается ультразвуковой излучатель, тем выше эффект ультразвукового воздействия.

Цель исследования – улучшение результатов лечения открытых переломов трубчатых костей путем сочетания контактного низкочастотного ультразвукового воздействия в условиях внеочагового остеосинтеза.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности формирования костной мозоли при сочетании внеочагового чрескостного остеосинтеза и контактного пролонгированного ультразвукового воздействия.

2. Оценить динамику общеклинических и костно-специфических показателей, характеризующих течение процесса регенерации костной ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на беспородных половозрелых собаках массой $22,7 \pm 4,1$ кг ($M \pm \sigma$), которые были разделены на 2 группы по 7 особей, основную и контрольную. Моделирова-

ние открытого перелома производилось на плечевой кости. Выполнялся продольный линейный разрез по передней поверхности средней трети плеча, затем поперечная остеотомия плечевой кости при помощи узкого долота с последующей обработкой места остеотомии сферической фрезой 1,8 мм граверной машинкой Skil (Bosch, Германия) с частотой 5000 об/мин, в результате чего формировался дефект размером 2 мм. Остеосинтез выполнялся моделью аппарата внешней фиксации, состоящей из 2 стандартных диафизарных стержней-шурупов и канюлированных 2 стержней-шурупов [5], которые фиксировались в планке аппарата внешней фиксации. В каждый отломок фиксировалось по 2 стержня-шурупа: ближе к месту перелома – канюлированный, дальше от места перелома – стандартный (рис. 1, а). Рана ушивалась послойно после установки аппарата внешней фиксации (для контроля за репозицией).

Оперативное вмешательство проводилось под внутривенным наркозом – рометар (ксилазина гидрохлорид) 1 мл на 10 кг массы тела животного (внутривенно струйно) и золетил (тилетамин гидрохлорид) 1 мл/ч на 10 кг массы тела животного (внутривенно капельно), после премедикации 0,5 мл атропина 0,1 % и 0,5 мл димедрола 1 внутримышечно. Животные контрольной группы в процессе лечения не получали ультразвуковое воздействие, собаки основной группы получали ежедневное ультразвуковое низкочастотное воздействие, которое осуществлялось при помощи ультразвукового аппарата «Ярус-М» путем введения через полое отверстие канюлированного стержня-шурупа волновода в полость костномозгового канала (до упора в кортикальный слой). Озвучивание проводилось в течение 3 минут еже-

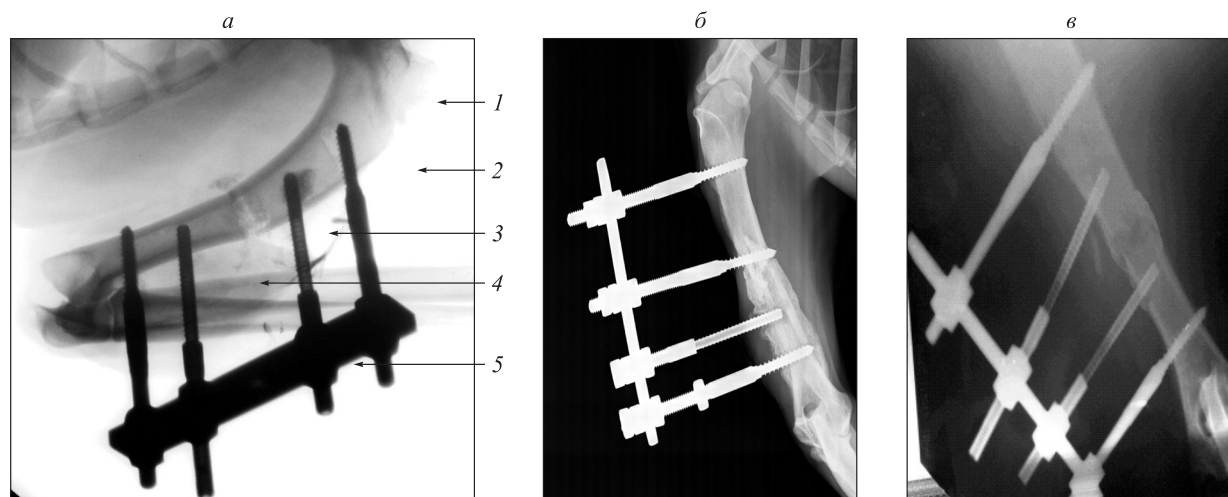


Рис. 1. Послеоперационная рентгенограмма (а: 1 – плечевая кость, 2 – стандартный стержень-шуруп, 3 – место перелома, 4 – канюлированный стержень-шуруп, 5 – планка аппарата внешней фиксации); консолидация в основной (б) и контрольной (в) группах

дневно на протяжении 42 дней от момента моделирования перелома, под кратковременным внутривенным наркозом (пропофол 4 мг/ кг массы тела животного). На время озвучивания попеременно производилось ослабление гаек стержня-шурупа канюлированного в проксимальном и дистальном отломках. Рентгенологический контроль осуществлялся на стационарном рентгенологическом аппарате FDR AcSelerate (Fujifilm, Япония), на расстоянии до рентгенологической трубки 1,1 м, с параметрами рентгеновских лучей 40 кВ, 63 мА, 200 мс. Животные выводились из эксперимента на 42 сутки.

Оценка результатов лечения проводилась по времени начала опоры на оперированную конечность, по времени отрицательной клинической пробы, которая определялась по исчезновению патологической подвижности при снятии планки аппарата внешней фиксации. Также оценивалась плотность костной мозоли на снимках с помощью программы eFilm 310T21 (Merge Healthcare, США). Из лабораторных показателей определяли уровень лейкоцитов, СОЭ, активность щелочной фосфатазы в крови.

Все эксперименты соответствовали международным и национальным нормативным актам обращения с лабораторными животными. Животные выводились из эксперимента в соответствии с правилами эвтаназии. Биологический материал утилизировался в соответствии с существующим законодательством.

При анализе распределения выборки критерием Шапиро–Уилка получено распределение, отличное от нормального. Поэтому для статистической обработки данных использовались методы непараметрической статистики (определение медианы, верхнего и нижнего квартилей (Me [LQ; HQ]), U-критерий Манна–Уитни).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех животных обеих групп произошло заживление раны первичным натяжением, сроки заживления ран были одинаковыми (см. таблицу). В области проведения стержней у всех животных

сохранялось отделяемое геморрагического характера в течение всего срока лечения. Опору на оперированную конечность с аппаратом внешней фиксации животные основной группы осуществляли достоверно раньше, также у них раньше, чем у собак контрольной группы, исчезала патологическая подвижность (см. таблицу). На контрольных рентгенограммах на 42 сутки после операции получены следующие результаты консолидации (рис. 1, б, в): если в основной группе консолидация наступила у всех животных, то в контрольной группе – только у пяти, у трех из которых она была вялая, а еще у двух собак образовался ложный сустав. Плотность костной мозоли в основной группе была статистически значимо выше, чем в контрольной (см. таблицу).

В первые сутки после операции в обеих группах наблюдалось повышение уровня лейкоцитов, которое нормализовалось к 7 суткам в основной группе и к 10–14 суткам в контрольной группе (рис. 2, а). У животных обеих групп СОЭ вначале увеличивалась, а к 10–14 суткам нормализовалось (рис. 2, б). Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови изменялась следующим образом (рис. 2, в). В ранние сроки после операции у животных обеих групп она увеличивалась по сравнению с исходным уровнем, при этом у собак основной группы максимум активности щелочной фосфатазы (299,0 [284,0; 319,9] ЕД/л) приходился на 10 сутки, с 21 суток величина показателя начинала снижаться (284,6 [276,1; 310,4] ЕД/л) и достигала исходного уровня к 35 суткам (248,0 [240,7; 270,7] ЕД/л). У животных контрольной группы активность щелочной фосфатазы достигала максимума (285,1 [274,1; 307,2] ЕД/л) к 21 суткам, с 35 суток она уменьшалась до 271,0 [260,8; 292,3] ЕД/л, не достигая исходного уровня.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные доказывают влияние низкочастотного ультразвукового воздействия на течение процесса консолидации переломов. При использовании контактного низкочастотного воз-

Таблица

Клинические результаты послеоперационного заживления открытого перелома плечевой кости у животных контрольной и основной групп, Me [HQ; LQ]

Показатель	Контрольная группа	Основная группа	p
Срок заживления раны, сут	7 [7; 8]	7 [7; 8]	0,37
Опора на оперированную конечность, сут	10 [9; 11]	8 [6; 8]	0,0013
Исчезновение патологической подвижности, сут	41 [41; 42]	38 [37; 39]	0,0017
Плотность костной мозоли, ед. опт. пл.	135,2 [120,7; 145,6]	162,2 [160,0; 168,0]	0,0017

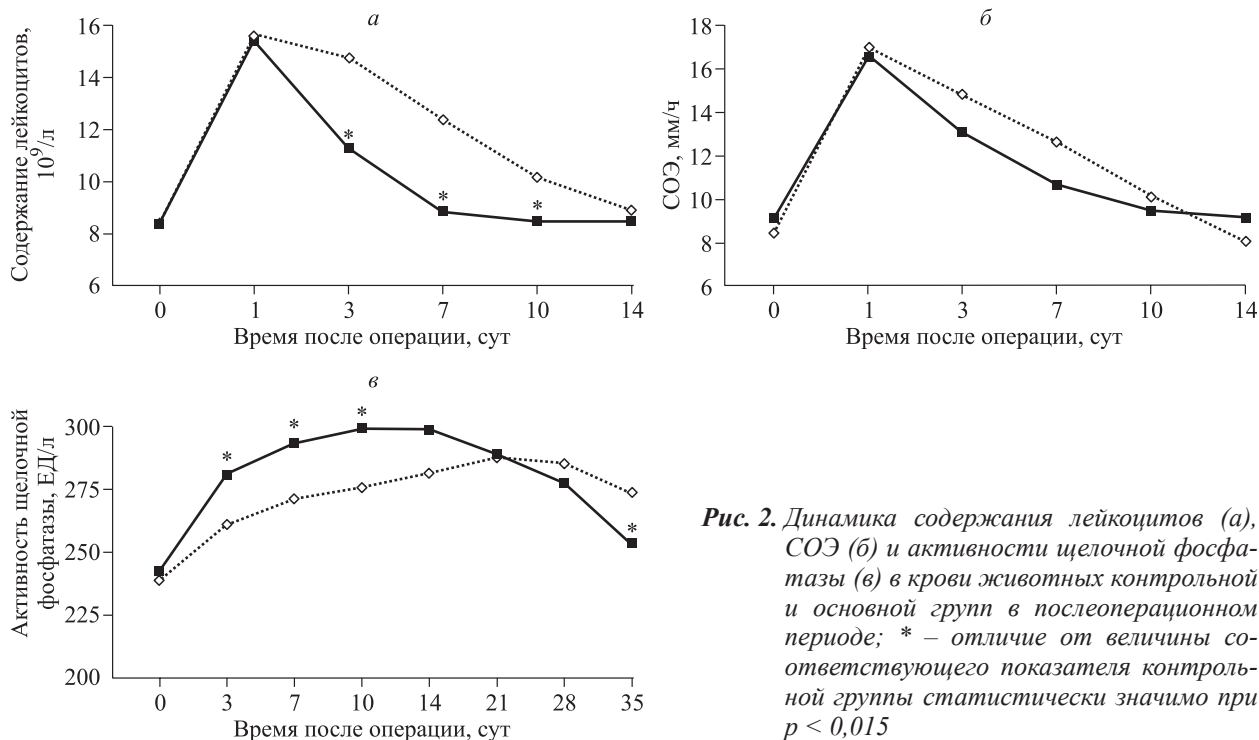


Рис. 2. Динамика содержания лейкоцитов (а), СОЭ (б) и активности щелочной фосфатазы (в) в крови животных контрольной и основной групп в послеоперационном периоде; * – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при $p < 0,015$

действия наблюдается достоверное снижение болевого синдрома, позволяющее нагружать оперированную конечность в более ранние сроки – на 8 сутки в основной группе и 10 сутки в контрольной ($p = 0,0013$). Клиническая консолидация, определяемая по исчезновению патологической подвижности, также наступала в достоверно более ранние сроки – на 38 сутки в основной и 41 сутки в контрольной группе ($p = 0,0017$). Результаты консолидации показывают, что выбранный способ формирования перелома и остеосинтеза обеспечивает сочетание неблагоприятных условий для регенерации костной ткани. В контрольной группе только у 2 животных (29 %) достигнута консолидация перелома, в то время как в основной группе благодаря использованию дополнительной стимуляции костной регенерации она наблюдалась у всех собак, при этом плотность костной мозоли у них была выше, чем в контроле ($p = 0,0017$). Активность щелочной фосфатазы крови отражает активность остеобластического процесса. В основной группе определяется статистически значимое повышение активности щелочной фосфатазы на ранних этапах регенерации (на 3, 7, 10 сутки) ($p = 0,04$), также раньше наблюдается ее нормализация (к 35 суткам) ($p = 0,03$). Послеоперационные раны зажили у всех животных первичным натяжением, поэтому можно оценить только отсутствие неблагоприятного воздействия ультразвука на мягкие ткани. У всех животных на первые сутки после операции

наблюдалось повышение уровня лейкоцитов и СОЭ. Установлено статистически значимо более быстрое уменьшение лейкоцитоза, которое в основной группе происходило начиная уже с 3 суток, однако значимого влияния на нормализацию уровня СОЭ не выявлено.

ВЫВОДЫ

1. Низкочастотное контактное ультразвуковое воздействие в условиях внеочагового чрескостного остеосинтеза способствует ускорению консолидации переломов – в основной группе на 17 % выше плотность костной мозоли, на 11 % раньше исчезала патологическая подвижность.
2. Низкочастотное контактное ультразвуковое воздействие способствует наступлению полноценной консолидации переломов при наличии факторов, предрасполагающих к нарушению регенерации костной ткани (в основной группе – консолидация 100 %, в контрольной – полноценная консолидация в 26 % случаев)
3. В условиях ультразвукового контактного воздействия наблюдается более быстрая нормализация лабораторных показателей (нормализация уровня лейкоцитов в срок на 50 % раньше), однако значимого изменения уровня СОЭ нет. В основной группе наблюдается повышение активности щелочной фосфатазы на 18 % к 14 суткам, в контрольной на 12 % к 21 суткам ($p = 0,03$), нормализация показателя в основной группе на

ступает к 35 суткам, в контрольной группе к этому сроку активность фермента повышена ($p = 0,04$).

4. Ультразвуковое воздействие способствует более быстрому купированию болевого синдрома (опора на оперированную конечность на 2 суток раньше)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акоюн В.Б., Еришов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами // Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. 225 с.

2. Бялик Е.И., Соколов В.А., Семенова М.Н. и др. Особенности лечения открытых переломов длинных костей у пострадавших с политравмой // Вестн. травматол. ортопедии. 2002. (4). 3–8.

3. Выборнов Д.Ю., Тарасов Н.И., Петров А.М. Оценка факторов риска и прогнозирование нарушений консолидации переломов у детей // Вопр. соврем. педиатрии. 2006. (1). 120.

4. Ключин Н.М., Аранович А.М., Шляхов В.И. Новые технологии лечения больных хроническим остеомиелитом – итог сорокалетнего опыта приме-

нения метода чрескостного остеосинтеза // Гений ортопедии. 2011. (2). 27–33.

5. Пат. № 143507 РФ. Стержень-шуруп для аппарата внешней фиксации / Л.Б. Резник, К.Ю. Рожков, А.А. Новиков; опубл. 27. 07. 2014.

6. Резник Л.Б., Дзюба Г.Г., Новиков А.А. Эффективность применения ультразвука для удаления костного цемента при ревизионном эндопротезировании // Травматол. ортопедия России. 2012. (1). 30–35.

7. Goodship A.E., Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures // J. Bone Joint Surg. Br. 1985. 6. 650–655.

8. Ramli R., Reher P., Harris M. The effect of ultrasound on angiogenesis: an in vivo study using the chick chorioallantoic membrane // Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 2009. 24. (4). 591–596.

9. Shi S.F., Zhang X.L., Zhu C. Ultrasonically enhanced rifampin activity against internalized Staphylococcus aureus // Exp. Ther. Med. 2013. 5. (1). 257–262.

10. Yang K.H., Parvizi J., Wang S.J. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model // J. Orthop. Res. 1996. 14. 802–809.

USING THE CONTACT ULTRASONIC EXPOSURE IN THE TREATMENT OF OPEN FRACTURES OF LONG BONES (EXPERIMENTAL STUDY)

**Leonid Borisovich REZNIK¹, Konstantin Yur'evich ROZHKOV¹,
German Grigor'evich DZYUBA¹, Aleksey Alekseevich NOVIKOV²,
Dar'ya Aleksandrovna LEBEDEVA², Dmitriy Viktorovich KOTOV¹**

¹ *Omsk State Medical University
644099, Omsk, Lenin str., 12*

² *Omsk State Technical University
644099, Omsk, Mir av., 11*

Violation of reparative regeneration of bone tissue in the treatment of open fractures is the actual problem. The main method of treatment of open fractures - extrafocal osteosynthesis does not solve all the problems of the treatment, the regeneration is required the stimulation. The low frequency ultrasound exposure is one of the stimulation factors. Aims: to improve the results of treatment of open fractures of long bones by combining extrafocal osteosynthesis and low-frequency ultrasonic treatment. Materials and methods. The study was conducted on adult mongrel dogs with modeled open fracture of humerus. The osteosynthesis has been carried out with the external fixation device consisting of 2 standard rod-screws and 2 hollow rod-screws being held in the bracket external fixation device. The ultrasound exposure has been operated through the hollow rod-screws by introducing ultrasound waveguide «Tier-M». The results. The fracture union has been reached animals of the main group (with ultrasonic exposure). In control group there were 28 % of fracture union, 44 % of sluggish consolidation and 28 % of false joint. Leaning on the operated limb and absence of abnormal mobility have been significantly earlier revealed in the main group and the callus optical density was higher in the main group compare to the control group. As well as leukocytes level and alkaline phosphatase activity normalized in main group significantly earlier, herewith alkaline phosphatase activity was significantly higher in early post surgery period in the main group compared to the control. Discussion. Contact ultrasound exposure promotes earlier pain management and increase in the callus density, it reduces the effects of unfavorable factors leading to the sluggish consolidation and false joints forming. It increases the activity of osteoblastic (increased activity of alkaline phosphatase). Conclusions. Contact sonication under extrafocal transosseous osteosynthesis improves the results of treatment of open fractures of long bones.

Key words: open fractures, ultrasonic treatment, stimulation of bone formation.

*Reznik L.B. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of traumatology and orthopedics,
e-mail: omsktravma@mail.ru*

Rozhkov K.Yu. – postgraduate student of the department of traumatology and orthopedics, e-mail: kosro@gmail.com

*Dzyuba G.G. – candidate of medical sciences, associate professor the department of traumatology and orthopedics,
e-mail: germanort@mail.ru*

*Novikov A.A. – doctor of technical sciences, professor of department of mechanical engineering and materials
science, materials science and technology section of the construction materials*

Lebedeva D.A. – assistant professor of chair for mechanical engineering and materials science

Kotov D.V. – traumatologist – orthopedist, e-mail: egkin.kot@mail.ru

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ УШНОЙ РАКОВИНЫ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ПОЛА ЧЕЛОВЕКА

**Владимир Павлович НОВОСЕЛОВ¹, Сергей Владимирович САВЧЕНКО¹,
Екатерина Владимировна ПЯТКОВА², Владимир Эдуардович ЯНКОВСКИЙ³,
Александр Петрович НАДЕЕВ¹, Татьяна Августовна АГЕЕВА¹,
Юрий Владимирович ЧИКИНЕВ¹, Алексей Станиславович ПОЛЯКЕВИЧ¹**

¹ ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет Минздрава России
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

³ ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России
656038, г. Барнаул, просп. Ленина, 40

В работе представлены новые данные о возможности использования предложенной методики комплексной морфологической оценки ушной раковины для определения пола человека. При выполнении методики необходима определенная последовательность выполнения основных этапов исследования. На первом этапе проводится определение 12 метрических размеров между 16 реперными точками, нанесенными на каждую из ушных раковин по 4 направляющим осевым линиям. Предложенный способ антропометрии ушной раковины существенно расширяет возможности судебно-медицинской экспертизы и может быть рекомендован для повышения эффективности идентификации личности, в том числе по останкам неизвестных с целью определения пола.

Ключевые слова: морфология, ушная раковина, установление пола.

Ушная раковина человека является анатомическим образованием, которое начинает определяться уже с 4-й недели беременности, к 20-й неделе приобретает форму, практически полностью соответствующую уху взрослого человека, и сохраняет свои индивидуальные особенности, характеризующие конкретного индивидуума, на протяжении всей его жизни [7–10]. Получение новых данных об особенностях конфигурации ушной раковины в зависимости от пола человека в различные возрастные периоды является информативным не только для морфологов-гистологов, но и для прикладного использования в судебной медицине с целью идентификации личности [10]. Кроме того, структура ушной раковины, основу которой составляет хрящевая ткань, позволяет ей оставаться сохранной на протяжении длительно-

го постмортального периода, что позволяет рассматривать ушную раковину как важный объект судебно-медицинского исследования при установлении пола [11].

Проблема определения пола человека как одного из этапов отождествления личности в последнее время приобрела большое значение в связи со значительным ростом судебно-медицинских идентификационных исследований, обусловленных масштабными, в том числе техногенными, катастрофами [1, 3, 5]. Для экспертной практики необходима разработка и внедрение новых высокоэффективных методов морфологического исследования, позволяющих значительно повысить научную доказательность экспертного суждения о идентификационной значимости [2].

Новоселов В.П. – д.м.н., зав. кафедрой судебной медицины, e-mail: sme.ngmu@mail.ru

Савченко С.В. – д.м.н., проф. кафедры судебной медицины, e-mail: sme@sibsme.ru

Пяткова Е.В. – ассистент кафедры судебной медицины, e-mail: katerina_wp@mail.ru

Янковский В.Э. – д.м.н., проф. кафедры судебной медицины и права с курсом ФПК и ППВ, e-mail: yankovskiy-sme@yandex.ru

Надеев А.П. – д.м.н., зав. кафедрой патологической анатомии, e-mail: nadeevngma@mail.ru

Агеева Т.А. – д.м.н., проф. кафедры патологической анатомии, e-mail: pat_anat@mail.ru

Чикинев Ю.В. – д.м.н., зав. кафедрой госпитальной и детской хирургии, e-mail: chikinev@inbox.ru

Полякевич А.С. – д.м.н., доцент кафедры госпитальной и детской хирургии, e-mail: randorier@mail.ru

Таким образом, оценка морфологических особенностей ушной раковины с целью установления пола человека является актуальной для установления пола человека при отождествлении личности. Кроме того, следует отметить, что возможность проведения судебно-медицинской краниофациальной и судебно-портретной идентификации личности в экспертной практике имеется не всегда, особенно когда в качестве объекта выступает отдельный фрагмент тела [3, 6, 12]. При наличии прижизненной фотографии предполагаемой жертвы с наличием ушных раковин возможна идентификация личности с высокой степенью достоверности. В настоящем исследовании за основу была взята методика, впервые предложенная А. V. Iannarelli [10]. Однако существуют определенные ограничения ее применения, поскольку А. V. Iannarelli использовал только правые ушные раковины, кроме того, в его методике существует сложность в определении месторасположения анатомических ориентиров, а также допущенные неточности в определении первой из точек, что ведет к получению искаженных результатов.

Целью исследования послужило выявление информативности антропометрического исследования ушных раковин при установлении пола человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основу работы составили данные, полученные при комплексной оценке антропометрических параметров ушных раковин человека. Материалом для исследования послужили ушные раковины, полученные при проведении аутопсии у лиц, погибших от различных причин (580 ушных раковин мужчин и женщин различных возрастных групп). Исследование проводилось на трупах, поступивших в танатологические отделения Красноярского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы и Новосибирского областного клинического бюро судебно-медицинской экспертизы в период с 2010 по 2012 г.

Материал был систематизирован по возрастным группам и полу в соответствии со схемой постнатального онтогенеза согласно классификации, принятой на Всесоюзной конференции по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии АПН СССР (1965). Первая группа (юношеский возраст) – 17–20 лет; 2-я группа (зрелый возраст) – 21–35 лет; 3-я группа (первый период зрелого возраста) – 36–50 лет; 4-я группа (второй период зрелого возраста) – 51–60 лет; 5-я группа (пожилой возраст) – 61–75 лет. Все исследования проводились с письменного разреше-

ния близких или родных умершего на основе принципа добровольности.

В процессе выполнения антропометрии определялись размеры правой и левой ушной раковины мужчин и женщин с помощью горизонтальной, вертикальной и двух диагональных направляющих линий. Визуально определяли 16 реперных точек, ограничивающих ушную раковину, где R – right (правая), L – left (левая). R1, R6 (L1, L6) были представлены крайними боковыми точками завитка на верхней вертикальной направляющей линии; R2, R7 (L2, L7) – крайние боковые точки завитка на верхней диагональной направляющей линии; R3, R8 (L3, L8) – крайние боковые точки завитка на горизонтальной направляющей линии; R4, R9 (L4, L9) – крайние боковые точки завитка на нижней диагональной направляющей линии; R10 (L10) – край раковины на верхней вертикальной направляющей линии; R11 (L11) – край раковины на верхней диагональной направляющей линии; R12 (L12) – край раковины на горизонтальной направляющей линии; R13 (L13) – край раковины на нижней диагональной направляющей линии; R14 (L14) – край противозавитка на нижней вертикальной направляющей линии; R16 (L16) – край козелка на горизонтальной направляющей линии; R15 (L15) – край раковины на нижней диагональной направляющей линии; R5 (L5) – край мочки на нижней вертикальной направляющей линии (рис. 1).

Согласно реперным точкам определяли 12 метрических размеров (R1 – R12, L1 – L12): R1 (L1) – длина верхней части оправы завитка (на вертикальной направляющей линии), R2 (L2) – длина верхней части оправы завитка (на верхней диагональной направляющей линии), R3 (L3) – длина части оправы завитка (на горизонтальной направляющей линии), R4 (L4) – длина окончания оправы завитка (на нижней диагональной направляющей линии), R5 (L5) – длина верхней части противозавитка (на вертикальной направляющей линии), R6 (L6) – длина верхней части

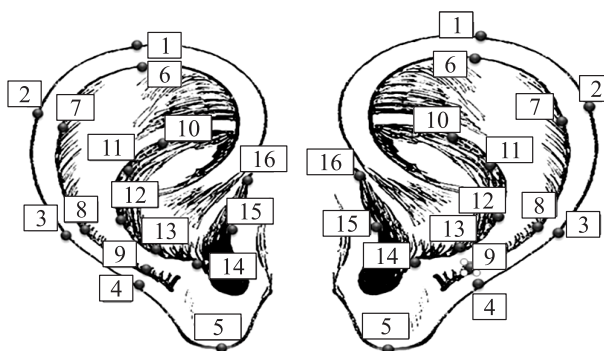


Рис. 1. Разметка реперных точек на ушных раковинах

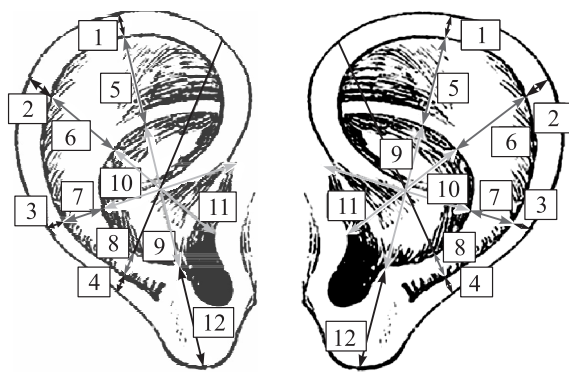


Рис. 2. Определение метрических размеров ушных раковин

противозавитка (на верхней диагональной направляющей линии), R7 (L7) – длина части противозавитка (на горизонтальной направляющей линии), R8 (L8) – длина окончания противозавитка (на нижней диагональной направляющей линии), R9 (L9) – полная длина раковины (на вертикальной направляющей линии), R10 (L10) – полная ширина раковины (на горизонтальной направляющей линии), R11 (L11) – диагональная длина раковины (на диагональной направляющей линии), R12 (L12) – длина мочки (на вертикальной направляющей линии) (рис. 2).

При проведении статистической обработки антропометрических данных для описания изучаемых признаков использовали среднее арифметическое (*M*), медиану, минимальное (*Min*) и максимальное (*Max*) значение признака, проценти́ли ($P_{25;75}$). Сравнение выборочных долей проводили при помощи *z*-критерия [4]. При проверке статистических гипотез принимали во внимание уровни значимости: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$, $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении антропометрии 580 ушных раковин мужчин и женщин выявлен ряд изменений, имеющих индивидуальный характер. Установлено, что морфологические параметры правой ушной раковины не всегда совпадают с

морфологическими параметрами левой ушной раковины у одного и того же человека.

Длина правой ушной раковины у женщин колебалась от 5,2 до 8,3 см, разброс значений в пределах межцентильного интервала P_{25-75} составлял 6,8–7,8 см, значение медианы – 7,2 см; длина левой ушной раковины – от 5,1–7,6 см, разброс значений в пределах межцентильного интервала P_{25-75} – 6,5–7,0 см, значение медианы – 6,8 см. Ширина правой ушной раковины у женщин колебалась от 2,1 до 4,0 см, разброс значений в пределах межцентильного интервала P_{25-75} составил 2,8–3,5 см, значение медианы – 3,0 см, а левой – от 2,3 до 4,7 см, разброс значений в пределах межцентильного интервала P_{25-75} – 2,8–4,2 см, значение медианы – 3,8 см (см. таблицу).

У мужчин длина правой ушной раковины находилась в пределах от 5,4 до 8,5 см, значение медианы – 6,8 см; длина левой ушной раковины была от 5,4 до 8,0 см, значение медианы – 7,2 см. Ширина правой ушной раковины у мужчин колебалась от 1,8 до 4,5 см, значение медианы – 3,2 см, а левой – от 1,7 до 4,3 см, значение медианы – 2,8 см. Ширина ушной раковины у мужчин была всегда меньше (при $p < 0,05$) длины, их соотношение составило 1 : 1,5, а у женщин – 1 : 2 ($p < 0,05$).

Наиболее значимые результаты были отмечены при оценке длины противозавитка по верхней диагональной направляющей линии. Асимметрия по этому признаку в 2 раза чаще встречалась у мужчин, чем у женщин. Длина противозавитка по горизонтальной направляющей линии отмечалась чаще у женщин (27 % случаев), у мужчин этот признак наблюдали в 13 % случаев. Данные признаки являются наиболее информативными для установления половой принадлежности.

Таким образом, представленные данные подтверждают, что ушная раковина мужчин и женщин имеют разные параметры и соотношение частей отношения. При использовании предложенной комбинации двенадцати метрических размеров ушной раковины в качестве основы для проведения морфологической оценки можно получить множество вариантов, в том числе характерных для конкретного человека, с целью иден-

Таблица

Средние размеры ушных раковин

Параметр	Женщины				Мужчины			
	R		L		R		L	
	Max–Min	M	Max–Min	M	Max–Min	M	Max–Min	M
Общая длина	8,3–5,2	6,436	7,6–5,1	6,479	8,8–5,6	6,643	8,0–5,4	6,583
Общая ширина	4,0–2,1	3,021	4,7–2,3	2,988	4,5–1,8	3,104	4,3–1,7	3,077

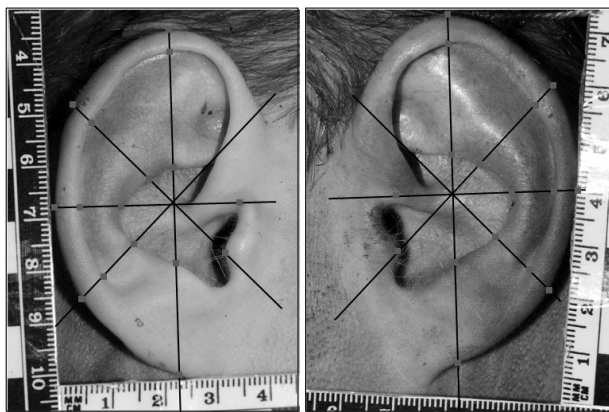


Рис. 3. Распределение реперных точек у мужчин

тификации личности. При этом важно отметить, что использование цифровых фотографий ушной раковины позволяет регистрировать реперные точки, отмечать по ним метрические размеры и на этой основе проводить идентификационное исследование (рис. 3).

С учетом вышеизложенного можно заключить, что при выполнении работы разработана новая методика исследования ушной раковины человека для определения пола. В методику, предложенную А. V. Iannarelli [10], внесены следующие изменения. Во-первых, материал систематизирован соответственно полу; во-вторых, исследовались обе ушные раковины; в-третьих, при проведении экспертной оценки ушных раковин изменено направление нанесения реперных точек с учетом хода анатомического завитка самой ушной раковины; основным принципиальным отличием предложенной методики являлось нанесение реперных точек в соответствии с разметкой направляющих линий; в-четвертых, оптимизирован процесс проводимых антропометрических измерений; в-пятых, использована оценка полученных параметров на основании проведенных измерений с использованием цифровых фототехнологий.

Все вышеизложенное позволяет считать рассматриваемую морфологическую методику перспективной для установления пола человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании выполненного исследования предложена методика комплексной морфологической оценки ушной раковины с целью установления пола, основанная на поэтапном антро-

пометрическом исследовании, в ходе которого проводится определение 12 метрических размеров между 16 реперными точками, нанесенными на каждую из ушных раковин по 4 направляющим осевым линиям. Оценка выявленных антропометрических показателей при исследовании ушных раковин с целью установления пола существенно расширяет возможности и эффективность идентификации личности, в том числе по останкам неизвестных лиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаханян Р.В., Ковалев А.В. Методические подходы к идентификации личности погибших в очагах пожаров // Судебно-стоматологическая экспертиза : состояние, перспективы развития и совершенствования : мат. конф. М., 2001. 21–23.
2. Бицарян М.С., Ромодановский П.О., Бариннов Е.Х. Использование особенностей строения слизистой оболочки твердого неба у жителей Республики Армения для идентификации личности // Вестн. судебной мед. 2012. 1. (2). 23–25.
3. Вдовина Н.Р., Имашева М.С., Ломтер М.Г. и др. Идентификация неопознанных лиц, погибших при авиакатастрофе самолета «ATR-72» 02.04.12г. около Тюмени // Вестн. судебной мед. 2013. 2. (1). 45–50.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
5. Звягин В.Н., Галицкая О.И., Негашева М.А. Биометрический способ описания головы неопознанного трупа с целью индивидуализации и идентификации личности // Суд.-мед. экспертиза. 2012. (5). 27–33.
6. Звягин В.Н., Галицкая О.И., Негашева М.А. Медико-криминалистическое исследование фрагментов тела при массовом поступлении трупов // Суд.-мед. экспертиза. 2012. (3). 4–11.
7. Павлова В.И., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. Хрящ. М.: Медицина, 1988. 210 с.
8. Хэм А., Кормак Д. Гистология : в 5 т. Т. 5. М.: Мир, 1983. 293 с.
9. Cameriere R., De Angelis D., Ferrante L. Ear identifications: a pilot study // J. Forensic Sci. 2011. 56. (4). 1010–1014.
10. Iannarelli A.V. Ear identification. Fremont: Paramount Publishing, 1989. 231 p.
11. Rehman M., Rashedul R., Islam A. Person identification using ear biometrics // Int. J. Computer Internet Manage. 2007. 15. (2). 1–8.
12. Victor B., Bowyer K., Sarkar S. An evaluation of face and ear biometrics // Pattern Recognition: Proc. 16th Int. Conf. Quebec, 2002. 1. 429–432.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE PINNA IN ESTABLISHING THE SEX OF THE INDIVIDUAL

**Vladimir Pavlovich NOVOSELOV¹, Sergey Vladimirovich SAVCHENKO¹,
Ekaterina Vladimirovna PYATKOVA², Vladimir Eduardovich YANKOVSKIY³,
Aleksandr Petrovich NADEEV¹, Tat'yana Avgustovna AGEEVA¹,
Yuriy Vladimirovich CHIKINEV¹, Aleksey Stanislavovich POLYAKEVICH¹**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Krasnoyarsk State Medical University of Minzdrav of Russia
660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak av., 1*

³ *Altai State Medical University of Minzdrav of Russia
656038, Barnaul, Lenin av., 40*

The article presents new data on the possibility of using the proposed method of complex morphological evaluation of the pinna to determine the sex of an individual. The certain sequence of the main stages of the study implementation has been required in the process of the technique accomplishment. The definition of 12 metric sizes between 16 reference points deposited on each ears towards 4 guide center lines has been carried out in the first stage. The proposed method of pinna anthropometry significantly extends the capabilities of forensic examination and can be recommended to improve the efficiency of identification including sex determination by body fragments of unidentified persons.

Key words: morphology, pinna, sex determination.

Novoselov V.P. – doctor of medical sciences, head of department of forensic medicine, e-mail: sme.ngmu@mail.ru

*Savchenko S.V. – doctor of medical sciences, professor of the department of forensic medicine,
e-mail: sme.ngmu@mail.ru*

Pyatkova E.V. – assistant of the department of forensic medicine, e-mail: katerina_wp@mail.ru

*Yankovskiy V.E. – doctor of medical sciences, professor of the department of forensic medicine and law,
e-mail: yankovskiy-sme@yandex.ru*

*Nadeev A.P. – doctor of medical sciences, head of the department of pathological anatomy,
e-mail: nadeevngma@mail*

*Ageeva T.A. – doctor of medical sciences, professor of the department of pathological anatomy,
e-mail: pat_anat@mail.ru*

*Chikinev Yu.V. – doctor of medical sciences, head of the department of hospital and pediatric surgery,
e-mail: chikinev@inbox.ru*

*Polyakevich A.S. – doctor of medical sciences, associate professor, department of hospital and pediatric surgery,
e-mail: randorier@mail.ru*

КОНСТРУИРОВАНИЕ СУПЕРПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Мария Владимировна КОТОВА,
Лев Михайлович ПОЛЯКОВ

ФГБНУ Научно-исследовательский институт биохимии
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе представлены материалы по получению химерного рекомбинантного полипептида в клетках *Escherichia coli* и превращению его в зрелую форму аполипопротеина А-I человека. В гене аполипопротеина А-I кодон, кодирующий во второй позиции белка глутаминовую аминокислоту, был заменен на кодон аспарагиновой аминокислоты, это позволило отщеплять лидерную последовательность химерного полипептида методом кислотного гидролиза. Кодоны рекомбинантной ДНК были оптимизированы для экспрессии в клетках *E. coli*, в результате выход химерного полипептида из культуры клеток в среднем составил около 200 мг/л.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, рекомбинантный белок, *E. coli*.

В последнее десятилетие аполипопротеин А-I (апо А-I) вызывает широкий интерес исследователей всего мира, что связано, прежде всего, с перспективами его использования при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, в частности атеросклероза [3]. В связи с этим получение белка апо А-I в препаративных количествах, а затем и в промышленных масштабах с целью дальнейшего использования имеет практическое значение. Классические методы получения апо А-I основаны на выделении белка из сыворотки крови. Однако по понятным этическим причинам этот источник белка не может быть использован в промышленных масштабах. С развитием технологий рекомбинантных ДНК появились системы для получения рекомбинантного белка апо А-I в клетках бактерий [7], дрожжей [8] насекомых и млекопитающих (клетки яичников китайского хомячка) [9]. Общим недостатком вышеупомянутых систем является низкий выход рекомбинантного апо А-I. Наибольший выход белка 100 мг/мл был достигнут в работе [11], где в качестве продуцентов использовались клетки *Escherichia coli*; кодоны гена были модифицированы с целью введения в него сайтов эндонуклеаз рестрикции, а белок был получен в виде химерного полипептида с лидерной последовательностью из 6 аминокислотных остатков (а.о.) гистидина. Мы предположили, что если оптимизация кодонов для экспрессии

гена в клетках *E. coli* будет нести целенаправленный характер, то уровень синтеза белка в клетках должен увеличиться. Целью настоящей работы являлись конструирование суперпродуцента рекомбинантного апо А-I человека на основе клеток *E. coli* и оптимизация условий получения рекомбинантного белка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

При конструировании модели рекомбинантной ДНК за основу была взята структура гена зрелой формы апо А-I человека (gi4557320 в базе данных National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/4557320>). Анализ частоты встречаемости редких кодонов в геноме *E. coli* проводили с помощью программы интернет-ресурса «Классической и молекулярной биологии» (http://molbiol.ru/scripts/01_11.html). Рекомбинантная ДНК, кодирующая химерный полипептид (Хапо А), размером 852 пар нуклеотидов, была синтезирована из нуклеотидов по принципу «*de novo*» фирмой «АТГ Сервис Ген» (Россия) и получена в составе плазмиды pBluescript. Для экспрессии гена Хапо А рекомбинантную ДНК встраивали в модифицированный вектор pET36b(+) «Novagen» (США), полученный нами ранее [6].

Рябченко А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: borrelia@mail.ru

Котова М.В. – аспирант лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: zerokiri@mail.ru

Поляков Л.М. – зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru

Трансформацию клеток *E. coli* проводили общеизвестным химическим методом с использованием хлорида кальция. Клетки выращивали на агаризованной среде LB (lysogeny broth), содержащей соответствующий антибиотик. Для наработки плазмидных ДНК использовали *E. coli* шт. NovaXGF «Novagen» (США). Плазмиды выделяли набором «Plasmid Maxiprep» «Евроген» (Россия), анализ проводили электрофоретически в 0,8 % геле агарозы с окрашиванием ДНК бромистым этидием.

Плазмиды гидролизировали эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI согласно инструкции фирмы-производителя ферментов «СибЭнзим» (Россия). Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим извлечением нужного фрагмента из геля набором «Cleanup Standard» «Евроген» (Россия). Фрагменты ДНК лигировали с помощью фермента T4 ДНК-лигазы согласно инструкции фирмы-производителя «СибЭнзим» (Россия). Подтверждение корректности структуры рекомбинантной ДНК, в составе экспрессирующего вектора, проводили с помощью секвенирования соответствующего района плазмиды в ЦКП «Геномика» СО РАН (Россия).

Для экспрессии гена Хапо А использовали клетки *E. coli* шт. BL21(DE3). Из отобранного клона *E. coli* выращивали ночную культуру в среде LB объемом 5 мл при 37 °С. На следующий день ночную культуру переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина. Клетки выращивали при активном перемешивании и 37 °С до оптической плотности $D_{600} = 0,8–1,2$ о.е. Для анализа отбирали пробу (контроль) и добавляли индуктор – изопропил- β -D-1-тиогактопиранозид (ИПТГ) до 50 мкМ. Далее клетки инкубировали 4 ч при аналогичных условиях либо 18 ч при 30 °С. По окончании инкубации отбирали пробу для анализа (опытный образец), оптическая плотность клеток достигала $D_{600} = 5,0–6,0$ о.е. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, осадок замораживали и хранили до выделения белка. Клеточные лизаты и белки анализировали в 12%-м полиакриламидном геле по Лэммли.

Для выделения Хапо А клетки разрушали обработкой ультразвуком (УЗГ 13-0,1/22, ФГУП «ВНИИТВЧ», Россия) в присутствии 6 М гуанидин-гидрохлорида. Выделение и очистку белка Хапо А из клеточного лизата проводили с помощью одностадийной аффинной хроматографии лизата клеток на колонке со смолой «Ni-NTA-Superflow» в денатурирующих условиях,

в присутствии 6 М мочевины. За основу метода был взят протокол фирмы-производителя смолы «Quiagen» (США). Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при $\lambda = 280$ нм.

Для получения зрелой формы белка апо А-I (Рапо А) химерный полипептид обессоливали методом диализа в фосфатно-солевом буфере – ФСБ (на 10 мл раствора белка 1 л буфера). После диализа к суспензии белка в соответствии с условиями, описанными в работе [11], добавляли муравьиную кислоту до конечной концентрации 45 %. Раствор белка выдерживали при 55 °С в течение 4 ч при периодическом перемешивании, после чего белок снова обессоливали диализом в ФСБ, затем осаждали центрифугированием (30 мин при 27000 g) после предварительного добавления сульфата аммония до 40%-го насыщения. Осадок растворяли в ФСБ, содержащем 6 М мочевины (объем буфера составлял половину от исходного объема белка). Рекомбинантный апо А отделяли от продуктов неполного гидролиза с помощью аффинной хроматографии в денатурирующих условиях на смоле «Ni-NTA-Superflow». Фракцию, содержащую Рапо А, разбавляли до 1 о.е./мл буфером, содержащим 6М мочевины, и обессоливали диализом в ФСБ. Далее Рапо А очищали от эндотоксинов с помощью смолы «Pierce High Capacity Endotoxin Removal Resin» («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу фирмы-производителя смолы. На заключительном этапе раствор белка обессоливали диализом в ФСБ и стерилизовали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,22 мкм «Syringe-Diven Filters» («Jet Biofilm», Корея). Стерильный чистый Рапо А хранили при 4 °С либо замораживали.

В случае ферментативного гидролиза Хапо А (отщепление лидерной последовательности) реакцию проводили при комнатной температуре в буфере со следующим составом: 50 мМ трис(гидроксиметил)аминометан, 0,5 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота, 1 мМ дитиотреитол, рН составлял 8,0. Отношение фермент:субстрат (в молях) варьировалось в пределах от 1:5 до 1:80, время реакции составляло 18 ч. В качестве фермента использовали протеазу вируса табачной мозаики (tobacco etch virus (TEV) protease), «Sigma-Aldrich», кат. № T4455 (США).

Выделение и очистку нативного апо А-I из плазмы крови человека проводили по методике, описанной в работе [4].

В работе количество выделяемого белка представлено как среднее значение величины \pm ошибка средней величины (n – количество опытов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оптимизации кодонов для экспрессии в клетках *E. coli* в структуру гена апо А-I (gi4557320) был внесен ряд мутаций: 33 синонимические замены кодонов (см. таблицу), были заменены все кодоны с частотой менее 11/1000 (за исключением 1 а.о. гистидина – частота осталась 8,8/1000). Кроме того, была сделана замена кодона, кодирующего во второй позиции зрелого белка апо А-I глутаминовую аминокислоту,

Таблица

Сравнение кодонов гена зрелой формы белка апо А-I человека (gi4557320 – «дикий тип») и гена Хапо А

№	Позиция а.о.	а.о.	Кодоны гена «дикого типа»	Кодоны гена Хапо А
1	2	Glu2Asp	GAA – 37.9	GAT – 32.9
2	3	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
3	4	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
4	7	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
5	10	Arg	CGA – 4.1	CGC – 18.3
6	22	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
7	27	Arg	AGA – 4.5	CGC – 18.3
8	31	Ser	TCC – 9.3	AGC – 15.0
9	36	Ser	TCC – 9.3	AGC – 15.0
10	39	Gly	GGA – 10.7	GGC – 25.5
11	42	Leu	CTA – 4.5	CTG – 45.8
12	44	Leu	CTA – 4.5	CTT – 12.6
13	46	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
14	55	Ser	TCC – 9.3	AGC – 15.0
15	64	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
16	66	Pro	CCT – 8.0	CCG – 19.3
17	79	Thr	ACA – 10.8	ACC – 21.3
18	83	Arg	AGG – 2.6	CGC – 18.3
19	99	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
20	114	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
21	126	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
22	143	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
23	165	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
24	181	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
25	188	Arg	AGA – 4.5	CGC – 18.3
26	193	His	CAC – 8.8	CAT – 12.5
27	203	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
28	209	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
29	211	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
30	214	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
31	220	Pro	CCC – 5.6	CCG – 19.3
32	233	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8
33	234	Glu	GAG – 18.8	GAA – 37.9
34	240	Leu	CTC – 10.1	CTG – 45.8

Примечание. В таблице указаны только те кодоны, которые были изменены относительно гена «дикого типа». Позиция аминокислоты обозначает позицию аминокислоты в зрелой форме белка. Частота встречаемости кодонов приведена на 1000 кодонов для генома *E. coli*.

на аспарагиновую (Glu2Asp). Замена Glu2Asp привела к возникновению в конечной структуре Хапо А неустойчивого к кислотам дипептида Asp-Pro (2–3 а.о. в структуре зрелого белка апо А-I), что в последующем позволяло отщеплять «лидерную последовательность» с помощью кислотного гидролиза.

Для эффективной экспрессии гена химерного белка и его последующей очистки к гену с 5'-конца были добавлены фрагменты ДНК, кодирующие «лидерную последовательность»: 6 а.о. гистидина; 6 а.о. проформы человеческого апо А-I; 15 а.о. бычьей панкреатической РНКазы А (S-tag); 6 а.о. проформы человеческого апо А-I (повтор фрагмента); 7 а.о. сайта узнавания протеазы вируса табачной мозаики (ENLYFQ/G). Включение проформы человеческого апо А-I обусловлено влиянием на уровень экспрессии гена в целом, в литературе показано, что его отсутствие на порядок уменьшает выход конечного рекомбинантного белка [10]. Проформа апо А-I была повторно вставлена для увеличения молекулярной массы Хапо А и облегчения идентификации белков Хапо А и Рапо А при анализе в полиакриламидном геле. Для этого же в структуру был введен фрагмент бычьей панкреатической РНКазы А. Сайт узнавания протеазы вируса табачной мозаики был добавлен с целью последующего отщепления лидерной последовательности аналогично работе [12]. На заключительном этапе планирования к модели рекомбинантной ДНК с 5'-конца был добавлен сайт эндонуклеазы рестрикции NdeI, а с 3'-конца – стоп-кодон TAA и сайт XhoI.

В результате экспрессии гена Хапо А в составе модифицированного экспрессирующего вектора pET36b(+) в клетках *E. coli* шт. BL21(DE3) был получен белок Хапо А с молекулярной массой ~ 33,4 кДа (рис. 1, дорожка 2). Выход Хапо А из биомассы, полученной индукцией клеток в течение 4 ч при 37 °С и концентрации индуктора 50 мкМ, составил 140 ± 20 мг/л культуры клеток ($n = 3$) (рис. 1, дорожка 3). Полученное количество белка на 40 % превышало результаты, представленные в работе [11], в которой авторы использовали аналогичную экспрессирующую систему (клетки *E. coli* шт. BL21(DE3), ген апо А-I под контролем промотора гена 10 бактериофага T7) и хроматографический способ очистки белка на аффинном сорбенте в денатурирующих условиях.

Следует также отметить, что ранее в данной системе (вектор pET36b(+) и клетки *E. coli* шт. BL21(DE3) или Rosetta 2), без предварительной оптимизации кодонов, нами был получен ряд гетерологичных для *E. coli* белков [1, 2, 6], в том числе человеческий тропонин Т и белок кардио-

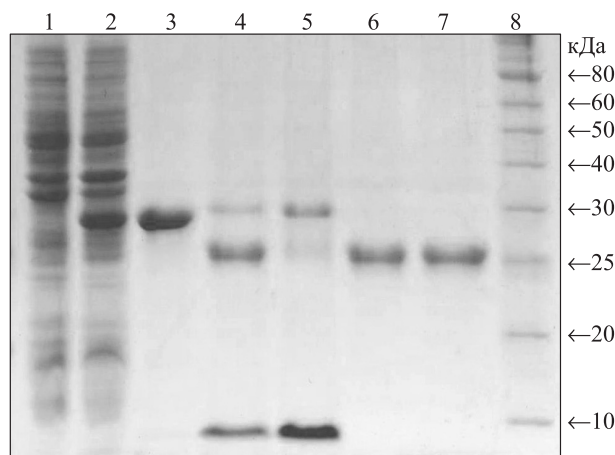


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы белковых образцов на различных стадиях получения белка Рапо А. Дорожки: 1 – лизат клеток-продуцентов, инкубированных без добавления индуктора (контроль); 2 – лизат клеток-продуцентов, инкубированных с 50 мкМ индуктора (биомасса для выделения белка); 3 – очищенный белок Хапо А (~ 33,4 кДа); 4 – продукты кислотного гидролиза Хапо А; 5 – продукты кислотного гидролиза Хапо А после извлечения Рапо А; 6 – очищенный белок Рапо А (~ 28 кДа); 7 – нативный апо А-I, выделенный из плазмы крови человека (~ 28 кДа); 8 – маркерные белки (10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 и 80 кДа; «Сибэнзим», Россия)

миоцитов человека, связывающий жирные кислоты [5], выход рекомбинантных белков варьировал в пределах 20–50 мг/л. Мы предполагаем, что высокий выход Хапо А в настоящей работе достигнут за счет оптимизации кодонов гена апо А-I для экспрессии в клетках *E. coli*.

Следующей задачей исследования стала оптимизация методов культивирования и индукции экспрессии гена Хапо А. Результаты определения зависимости уровня экспрессии гена Хапо А от концентрации индуктора ИПТГ показали, что при индукции в течение 4 ч при 37 °С максимальный уровень экспрессии достигался уже при концентрации 20–25 мкМ (рис. 2, дорожка 7). При увеличении концентрации индуктора до 1000 мкМ (1 мМ) уровень экспрессии не изменялся. Сравнения также проводились и при выделении белка из биомасс, полученных с различной концентрацией ИПТГ. Такое снижение концентрации индуктора, почти в 20 раз по сравнению с работами [9, 11], как и высокий выход рекомбинантного белка, вероятно, объясняется оптимизацией кодонов в структуре гена апо А-I для экспрессии в клетках *E. coli*.

При изучении зависимости уровня экспрессии гена Хапо А от времени инкубации кле-

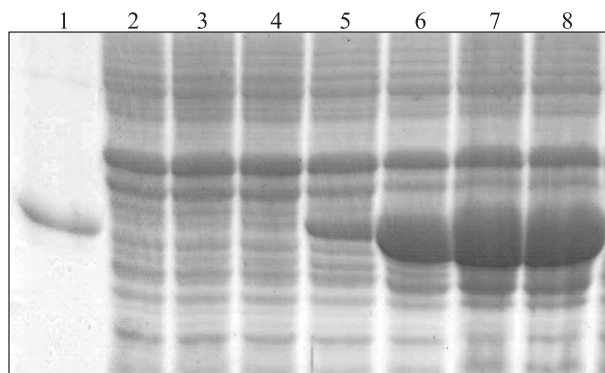


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы лизатов клеток-продуцентов Хапо А, предварительно инкубированных с различной концентрацией индуктора. Дорожки: 1 – очищенный Хапо А; 2 – лизат неиндуцированных клеток (контроль); 3–8 – лизаты клеток с добавлением индуктора в концентрации 0,05, 0,2, 1,0, 5,0, 20 и 100 мкМ соответственно

ток (концентрация ИПТГ 20 мкМ, температура 37 °С) установлено, что максимальный уровень экспрессии наблюдается уже через 3–4 ч (анализ клеточных лизатов не приводится).

Из литературных данных известно, что при экспрессии апо А-I в клетках *E. coli* белок накапливается в основном в тельцах включения [9, 11], поэтому для оптимизации мы использовали прием с увеличением времени инкубации клеток-продуцентов до 18 ч и понижением температуры до 30 °С. В этих условиях (50 мкМ ИПТГ) выход Хапо А достигал 270 мг и в среднем составил 202 ± 40 мг/л культуры клеток ($n = 6$), или $40,0 \pm 7,5$ мг из 1 г влажной биомассы. Вероятно, в этих условиях белок в основном локализовался в цитоплазме, что приводило к большому накоплению его в клетках.

Выход очищенного Рапо А, полученного с помощью кислотного гидролиза (рис. 1, дорожки 4–6), составлял $37 \pm 1,7$ мг из 100 мг исходного Хапо А ($n = 3$). Полученный белок с молекулярной массой ~28 кДа не имел двух аминокислотных остатков с N-конца (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), в остальном по первичной структуре он был идентичен зрелому белку апо А-I человека и при анализе в ПААГ показывал сходную подвижность (рис. 1, дорожки 6 и 7).

При получении Рапо А из Хапо А с помощью ферментативного гидролиза выход Рапо А имел низкое значение (данные не приведены). Мы наблюдали низкую степень гидролиза Хапо А даже при длительной инкубации реакционной смеси и высоком молярном отношении фермент:субстрат, равном 1:5. Следует заметить, что в работе [12]

гидролиз наблюдался уже после 30 мин инкубации при комнатной температуре. Мы предполагаем, что полученный нами Хапо А имеет стерическое препятствие для посадки фермента, в отличие от работы с аналогичной конструкцией [12]. Возможно, это было обусловлено повторным введением профрагмента апо А-I в структуру белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы на основе клеток *E. coli* шт. BL21(DE3) получен продуцент рекомбинантного химерного белка аполипопротеина А-I человека с высоким выходом белка – 202 ± 40 мг/л. Данный результат достигнут за счет оптимизации кодонов гена апо А-I для экспрессии в клетках *E. coli*. Оптимальными условиями культивирования клеток-продуцентов были следующие: выращивание клеток до логарифмической фазы роста, добавление индуктора до концентрации 50 мкМ и последующая инкубация клеток в течение 18 ч при 30 °С. В результате кислотного гидролиза химерного рекомбинантного белка может быть получен апо А-I человека зрелой формы в количестве 37 ± 2 мг из 100 мг исходного белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караваяев В.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Иммунохимический анализ рекомбинантного белка FlaA западно-сибирского изолята *Borrelia garinii* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. (4). 66–71.
2. Караваяев В.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Оценка значимости рекомбинантного белка DbpV спирохет *Borrelia garinii* для серодиагностики Лайм-боррелиоза // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. (3). 73–79.
3. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеины высокой плотности и аполипопротеин А-I: регу-

ляторная роль и новые терапевтические стратегии лечения атеросклероза // Атеросклероз. 2013. 9. (1). 42–53.

4. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е. Анализ взаимодействия липопротеинов и стероидных гормонов // Биомед. химия. 2011. 57. (3). 308–313.

5. Рябченко А.В., Афиногенова Г.Н., Беклемишев А.Б. Получение рекомбинантных белков – кардиомаркеров острого инфаркта миокарда // Кардиология на перекрестке наук: сб. науч. ст. II Междунар. конгр. Тюмень, 2011. 280–281.

6. Рябченко А.В., Караваяев В.С., Беклемишев А.Б. Сравнительный структурный и иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов OspC новосибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* // Бюл. СО РАМН. 2010. (2). 6–12.

7. Bergeron J., Frank P.G., Emmanuel F. et al. Characterization of human apolipoprotein A-I expressed in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. 1344. (7). 139–152.

8. Feng M.Q., Cai Q.S., Song D.X. et al. High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. 2006. 46. (2). 337–342.

9. Panagotopoulos S.E., Witting S.R., Horace E.M. et al. Bacterial expression and characterization of mature apolipoprotein A-I // Protein Expr. Purif. 2002. 25. (2) 353–361.

10. Pyle L.E., Fidge N.H., Barton P.A., Luong A., Sviridov D. Production of mature human apolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: propeptide is not essential for intracellular processing but may assist rapid secretion // Anal. Biochem. 1997. 253. (2). 253–258.

11. Ryan R.O., Forte T.M., Oda M.N. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I // Protein Expr. Purif. 2003. 27. (1). 98–103.

12. Tubb M.R., Smith L.E., Davidson W.S. Purification of recombinant apolipoproteins A-I and A-IV and efficient affinity tag cleavage by tobacco etch virus protease // J. Lipid Res. 2009. 50. (7). 1497–1504.

DESIGNING SUPERPRODUCER OF RECOMBINANT HUMAN APOLIPOPROTEIN A-I BASED ON ESCHERICHIA COLI CELLS

**Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Mariya Vladimirovna KOTOVA,
Lev Mikhaylovich POLYAKOV**

*Research Institute of Biochemistry
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2.*

This article presents materials on the production of a chimeric recombinant polypeptide in *E. coli* cells and its transformation into a mature form of human apolipoprotein A-I. Glu2Asp mutation was introduced into the gene apolipoprotein A-I, it is allowed to cleave the leader sequence of the chimeric polypeptide by acid hydrolysis. Codons of recombinant DNA were optimized for expression in *E. coli*, resulting in the output of the chimeric polypeptide from the cell culture averaged 200 mg/l.

Key words: apolipoprotein A-I, recombinant protein, *E. coli*.

Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, laboratory of medical biotechnology, e-mail: borrelia@mail.ru

Kotova M.V. – postgraduate student, laboratory of medical biotechnology, e-mail: zerokiri@mail.ru

Polyakov L.M. – head of the laboratory of medical biotechnology, e-mail: plm@niibch.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ КОНГЛОМЕРАТА БИОКЕРАМИЧЕСКИХ АЛЮМООКСИДНЫХ ГРАНУЛ

**Виктор Викторович РЕРИХ^{1,2}, Арташес Робертович АВETИСЯН¹,
Сергей Владимирович САВЧЕНКО², Владимир Андреевич БАТАЕВ³,
Аэлита Александровна НИКУЛИНА³, Альберт Игоревич ПОПЕЛЮХ³,
Анатолий Маркович АРОНОВ⁴, Екатерина Станиславовна СЕМАНЦОВА⁴**

¹ ФГБУ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

² ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

³ ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный технический университет 630073, Новосибирск, ул. Блюхера, 30/1

⁴ ХК ОАО «НЭВЗ-Союз»

Работа посвящена изучению и характеристике процесса интеграции конгломерата алюмооксидных биокерамических гранул в большой дефект губчатой костной ткани. Материал и методы. Изучались алюмооксидные полые биокерамические гранулы, пористые биокерамические гранулы на основе гидроксиапатита и гранулы депротенизированной костной ткани. Имплантации гранул производились в тела позвонков шести беспородных собак массой от 15 до 18 кг. Оценивалась характеристика врастания окружающих имплантаты тканей организма. Результаты. При гистологическом исследовании спустя 6 месяцев наблюдения установлено, что в периферической зоне конгломерата имплантированных гранул на основе алюмооксидной биокерамики отмечается проникновение новообразованной костной ткани с прямым контактом с их поверхностью, однако в центральной зоне конгломерата наблюдалось только врастание волокон соединительной ткани, что было характерно также для гранул депротенизированной костной ткани, хорошо апробированной в клинической практике. В отличие от предыдущих материалов, в случае имплантации гидроксиапатитовых гранул в центральной зоне конгломерата в двух случаях из шести отмечались пустые полости. Заключение. Изучаемые алюмооксидные биокерамические гранулы в отношении интеграции с окружающей костной тканью в эксперименте показали такие же результаты, что и хорошо апробированные гранулы депротенизированной костной ткани.

Ключевые слова: конгломерат гранул, остеointegrация, алюмооксидная керамика.

Компрессионные переломы тел позвонков с дефектом костной ткани требуют реконструктивного хирургического вмешательства с имплантацией различных материалов, в качестве которых могут быть использованы аутологичные и аллогенные костные трансплантаты или, как альтернатива, синтетические или природные заместители

костной ткани. В современной практике золотым стандартом среди трансплантатов и искусственных материалов, замещающих костную ткань, является аутологичный костный трансплантат. Практическое применение собственной костной ткани пациента сопряжено с ограниченным количеством данного заместителя, а ее забор нередко

Рерих В.В. – д.м.н., зав. травматолого-ортопедическим отделением № 1, проф. кафедры травматологии, ортопедии, e-mail: clinic@niito.ru

Аветисян А.Р. – аспирант, e-mail: avetis.med@gmail.com

Савченко С.В. – д.м.н., проф. кафедры судебной медицины

Батаев В.А. – д.т.н., проф., заместитель зав. кафедрой материаловедения в машиностроении

Никулина А.А. – к.т.н., доцент кафедры материаловедения в машиностроении

Попелюх А.И. – к.т.н., доцент кафедры материаловедения в машиностроении

Аронов А.М. – д.э.н., исполнительный директор по направлению медицинской и наноструктурированной керамики

Семанцова Е.С. – ведущий научный сотрудник

сопровождается осложнениями [6]. Кроме того, свободные аваскулярные костные трансплантаты подвержены частичной резорбции в имплантационном ложе, что может привести к их усталостному или перестроечному разрушению [1, 4]. Применение аллогенного костного трансплантата сопровождается опасностью развития реакции его отторжения организмом донора и передачи через материал патогенных агентов [9, 10].

Технологии тканевой инженерии позволяют избежать указанных выше рисков. К ним относятся замещение костного дефекта синтетическими и природными биоматериалами, способствующими миграции, адгезии и пролиферации клеток, синтезирующих межклеточное вещество костной ткани [2, 3]. Наиболее перспективны биокерамические материалы, их главное преимущество перед металлами и полимерами – превосходная биосовместимость [5, 9].

В клинической практике для восстановления дефектов тела позвонка в настоящее время используются инъекционные костные цементы на основе полиметилметакрилата, фосфатов кальция, пористые биокерамические гранулы на основе гидроксиапатита. Эти имплантаты довольно широко представлены на международном рынке биоматериалов, однако их практическое применение ограничено различными недостатками: низкая биологическая совместимость (термический некроз окружающих тканей, инкапсуляция имплантата), низкая прочность на сжатие оставшихся групп материалов, приводящая к их разрушению в нагружаемых локализациях.

Алюмооксидная биокерамика по своим физическим свойствам значительно превосходит биокерамику на основе гидроксиапатита [9, 10]. В литературе крайне мало сведений относительно способности алюмооксидных биокерамических гранул к остеоинтеграции, а также их применения для замещения дефектов костной ткани в нагружаемых локализациях скелета. Проведенные группой авторов исследования продемонстрировали способность интеграции алюмооксидных

биокерамических гранул в малых дефектах тел позвонков. Цель настоящего исследования – изучить остеоинтеграцию конгломерата алюмооксидных гранул, характеризовать процесс роста и распространения окружающих тканей в пространство между гранулами в различных частях дефекта тела позвонка лабораторных животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на шести беспородных собаках массой от 15 до 18 кг, им выполнялась имплантация синтетических пластических гранул в тела поясничных позвонков. Характеристика примененных материалов представлена в табл. 1. Все три вида пластических гранул имплантировались каждому животному в смежные позвонки. Послеоперационное наблюдение проводилось в течение 6 месяцев. По истечении указанного срока животные выводились из эксперимента, после чего осуществлялся забор материалов и их подготовка к морфологическому исследованию. Из забранных материалов сформированы три группы препаратов по 6 образцам с одним видом пластического материала: в группе 1 имплантатами служили гранулы Al_2O_3 , в группе 2 – гранулы ДПК, в группе 3 – гранулы CaP.

Непосредственно после оперативных вмешательств выполнялась обзорная спондилография в прямой и боковой проекциях поясничного отдела позвоночника. Затем, с целью регистрации рентгенологических изменений в локусах имплантации пластических гранул, осуществлялась контрольная рентгенография тех же областей в день вывода животных из эксперимента.

Эксперимент одобрен локальным этическим комитетом учреждения.

Хирургическая техника. Операции проводились с соблюдением требований асептики и антисептики в стерильных условиях операционной. Премедикация осуществлялась путем внутримышечного введения 2%-го раствора промедола (0,5 мл/кг), реланиума (5 мг), 1%-го раствора ди-

Таблица 1

Форма и прочность исследуемых гранул

Гранулированный заместитель	Биокерамические алюмооксидные цилиндры	Гранулы депротенизированной кортикостероидной костной ткани	Биокерамические гранулы на основе кораллового гидроксиапатита
Размер, мм	1	1–2	0,5–1,0
Вид пористости	Сквозная		Сквозная
Диаметр пор, мкм	500		400
Прочность на сжатие, МПа	Не менее 300	50–100	12
Сокращенное обозначение	Al_2O_3	ДПК	CaP

медрола (1 мл), общая анестезия – внутримышечным введением кетамина (15 мг/кг).

После подготовки кожных покровов, а также их трехкратной обработки антисептиком осуществлялся левосторонний косой внебрюшинный доступ. Рассекалась кожа, подкожная клетчатка, фасция. Тупым путем разводились волокна наружной и внутренней косой мышцы, рассекалась поперечная фасция. Брюшной мешок отводился медиально и вверх. Обнажались передние отделы тел двух смежных поясничных позвонков.

В каудальной части тела нижележащего позвонка на вентролатеральной поверхности слева сверлом диаметром 5 мм в направлении спереди назад и от периферии к центру формировался цилиндрический дефект костной ткани, слепо заканчивающийся в губчатом веществе тела позвонка глубиной примерно 6 мм. Дефект заполнялся пластическим материалом СаР. Аналогичным образом в краниальной части того же тела позвонка на вентролатеральной поверхности слева формировался дефект с теми же размерами, который замещался пластическим материалом Al_2O_3 . В каудальной части вышележащего тела смежного позвонка на вентролатеральной поверхности слева по описанной выше методике формировался дефект, который замещался пластическим материалом ДПК. Осуществлялся гемостаз по ходу операции, послойно накладывались швы на рану.

Подготовка материалов и морфологические методы исследования. Забор материалов для гистологических исследований осуществлялся путем блоковой резекции тел позвонков, содержащих пластические гранулы. Забранные тела позвонков очищались от мягких тканей, подготавливались к световой микроскопии путем фиксации, декальцинации и окрашивания, а к электронной микроскопии – посредством фиксации и дегидратации. Фиксация проводилась путем экспозиции препаратов в забуференном (рН 7,4) 10%-м растворе формалина в течение 3 суток с последующей дофиксацией в течение 1 суток в растворе, одна часть которого состояла из 1,5%-го раствора параформа, а вторая – из 1,5%-го раствора глутарового альдегида. Для электронной микроскопии проводилась дегидратация препаратов путем экспозиции в растворах спирта с возрастающей концентрацией. Дегидратированные препараты заливались эпоксидной смолой и направлялись на подготовку к электронной микроскопии.

Срезы препарата для исследований изготовлены на станке для малодеформационного резания металлов и керамик Minitom (Struers, Дания) при скорости вращения диска 60 об./мин. Плос-

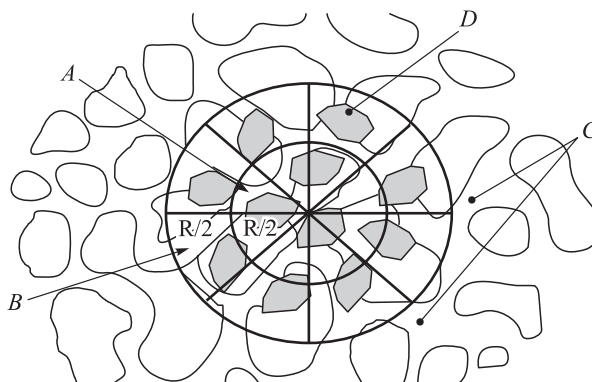


Рис. 1. Схема поверхности распила тела позвонка в месте имплантации конгломерата гранул (D) с обозначением границ его периферической (A) и центральной (B) зон; C – трабекулы костной ткани

кость распила пересекала локусы имплантации пластических гранул в костную ткань, таким образом был осуществлен доступ для изучения границы между костью и имплантатом. Образцы толщиной 5–10 мм были закреплены на предметных столиках с помощью токопроводящего углеродного скотча, затем в напылительной установке Q150T ES (Quorum Technologies, Великобритания) был нанесен слой золота толщиной 10 нм.

Подготовленные препараты с имплантатами были анализированы на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss EVO50 (Carl Zeiss AG, Германия). Структурные исследования проводились при ускоряющем напряжении 5 кВ в режиме регистрации вторичных электронов. На всех полученных во время электронной микроскопии микрофотографиях оценивались две зоны поверхности распила препарата в месте их имплантации – периферическая и центральная, схема распределения зон приведена на рис. 1. Каждая зона разделена на 8 равных секторов. В каждом секторе проводилась оценка морфологических данных следующим образом: если пространство между гранулами не было заполнено ни трабекулами костной ткани, ни волокнами соединительной ткани, то данному сектору балл не присваивался; если между гранулами отмечалось вращение волокон соединительной ткани, сектору присваивался 1 балл, а в случае вращающейся костной ткани – 2 балла. Затем баллы всех секторов каждой зоны суммировались, а полученный результат учитывался при статистической обработке данных. Проведено тестирование нормальности распределения в сравниваемых выборках. Гипотеза о нормальности распределения отвергалась, если достоверность критерия Шапиро–Уилка была меньше целевого уровня α (0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении экспериментов во время наблюдения за животными в послеоперационном периоде осложнений отмечено не было.

На микрофотографиях плоскости распила препаратов через зону имплантации в группе 1 отмечался конгломерат алюмооксидных гранул Al_2O_3 , а в группе 2 – гранулы ДПК с врастанием новообразованной костной ткани в пространство между гранулами в периферической зоне, где также наблюдался прямой контакт костной ткани с их поверхностью (рис. 2, а, в, рис. 3, а). Пространство между гранулами было заполнено волокнами соединительной ткани, которая также нарастала на их поверхность (рис. 2, в, рис. 3, б).

В отличие от групп 1 и 2, где контакт костной ткани и пластических гранул в периферической зоне конгломерата отмечался во всех препаратах, в группе 3, где были имплантированы

гранулы СаР, только в трех препаратах из шести наблюдали аналогичные результаты (рис. 4, а). В оставшихся препаратах отмечалась массивная соединительнотканная капсула, которая отделяла гранулы от новообразованной костной ткани (рис. 4, б). В двух препаратах в центральной зоне наблюдалась полость, в которой свободно располагались гранулы СаР (рис. 4, в).

Результаты балльной оценки полученных микрофотографий приведены в табл. 2. По количеству баллов, полученных при оценке периферической и центральной зон конгломератов, группы статистически достоверно не различались (табл. 3).

Таким образом, в группе 1 спустя 6 месяцев после имплантации конгломерата алюмооксидных гранул со сквозной порой в месте дефекта губчатой костной ткани тела позвонка поясничного отдела позвоночника беспородной собаки в периферической зоне конгломерата отмечается

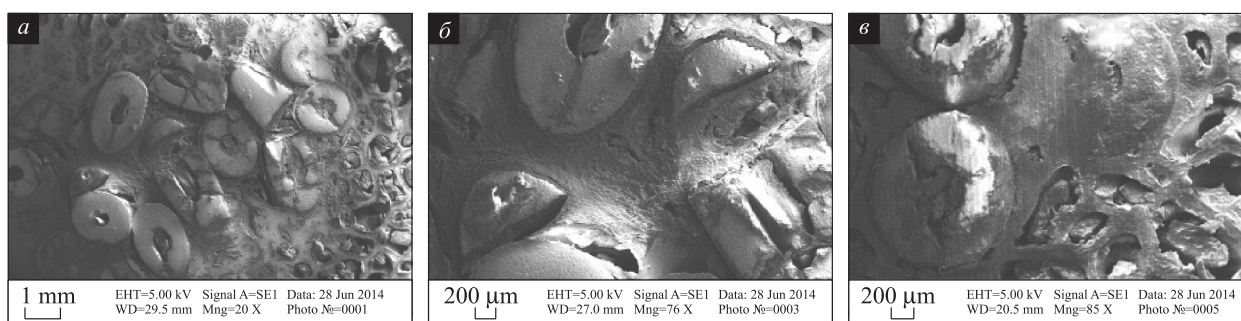


Рис. 2. Электронные микрофотографии в зоне имплантации конгломерата гранул Al_2O_3 спустя 6 месяцев после операции: а – поверхность распила тела позвонка, отмечается врастание новообразованной костной ткани в пространство между гранулами в периферической зоне (ув. $\times 3$); б – центральная зона, массивные волокна соединительной ткани, заполняющие пространство между гранулами (ув. $\times 76$); в – периферическая зона, пространство между гранулами заполнено новообразованной костной тканью, отмечается ее прямой контакт с поверхностью алюмооксидных биокерамических имплантатов (ув. $\times 76$)

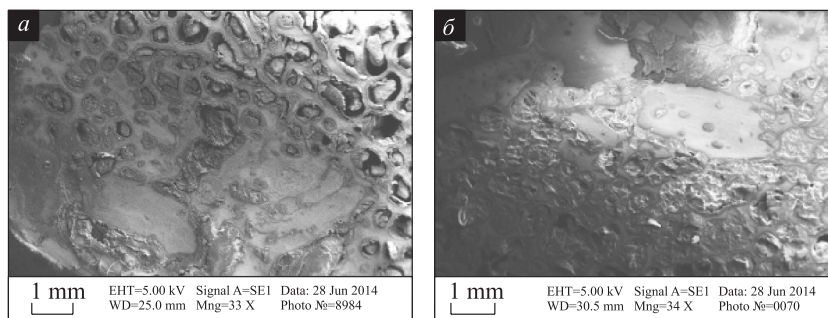


Рис. 3. Электронные микрофотографии места имплантации (а) и плоскости распила через локус имплантации (б) конгломерата гранул ДПК спустя 6 месяцев после операции: а – отмечается новообразованная костная ткань, которая заполняет сформированный дефект костной ткани и проникает между гранулами, контактируя с их поверхностью (ув. $\times 33$); б – в периферической зоне гранулы контактируют с новообразованной костной тканью, в пространстве между гранулами отмечают волокна соединительной ткани (ув. $\times 34$)

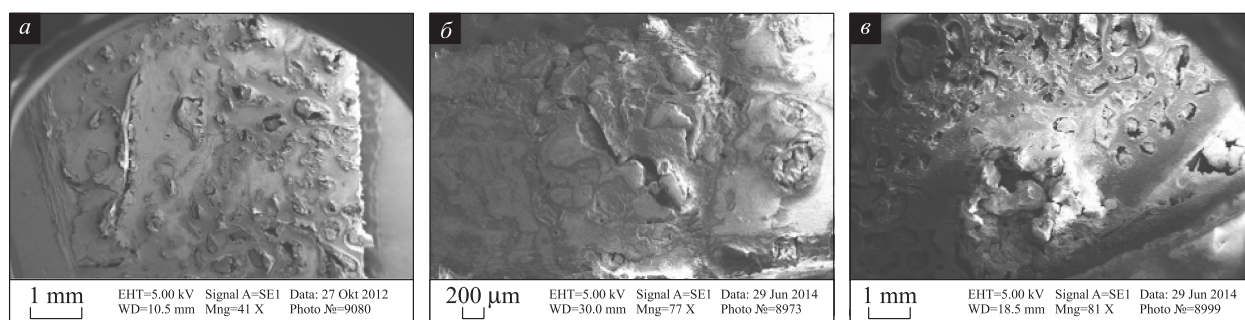


Рис. 4. Электронные микрофотографии плоскости распила через локус имплантации конгломерата гранул CaP спустя 6 месяцев после операции: а – как в периферической, так и в центральной зоне отмечается остеоинтеграция гранул (ув. $\times 31$); б – гранулы отграничены от костной ткани соединительнотканной капсулой (ув. $\times 77$); в – в центральной зоне гранулы свободно расположены в пустой полости (ув. $\times 31$)

Таблица 2

Результаты балльной оценки микрофотографий на предмет наличия остеоинтеграции имплантированных гранул

Группа	Номер препарата	Периферическая зона, баллы	Центральная зона, баллы
1	31 AL	16	8
	32 AL	16	8
	30 AL	9	6
	34 AL	13	13
	35 Al	14	11
	36 Al	12	13
2	31 D	13	10
	32 D	14	12
	30 D	13	7
	36 D	14	8
	34 D	14	14
	35 D	15	14
3	31 CaP	13	10
	32 CaP	12	8
	30 CaP	14	14
	34 CaP	15	13
	35 CaP	12	0
	36 CaP	8	0

Таблица 3

Достоверность различий при сравнении баллов, полученных при оценке конгломератов на микрофотографиях во второй серии экспериментов

	Периферическая зона				Центральная зона			
	Группа 1		Группа 2		Группа 1		Группа 2	
	pA	pM	pA	pM	pA	pM	pA	pM
Группа 2	0,667	0,810			0,572	0,522		
Группа 3	0,511	0,423	0,178	0,200	0,423	0,749	0,262	0,423

Примечание. Указана вероятность ошибки, определенная с помощью однофакторного дисперсионного анализа (pA) и U-критерия Манна–Уитни (pM).

проникновение новообразованной костной ткани в пространство между гранулами с прямым контактом с их поверхностью, однако в центральной зоне конгломерата отмечается только врастание волокон соединительной ткани, которая заполняет все свободное пространство между ними. Аналогичные результаты отмечаются и в группах 2 и 3, где в качестве пластического материала были применены гранулы депротенизированной костной ткани и биокерамические гранулы на основе кораллового гидроксиапатита со сквозной пористостью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении остеоинтеграции конгломерата пластических гранул спустя 6 месяцев после имплантации конгломерата алюмооксидных гранул со сквозной порой (Al_2O_3) в месте дефекта губчатой костной ткани тела позвонка поясничного отдела позвоночника беспородной собаки в периферической зоне конгломерата отмечается проникновение новообразованной костной ткани в пространство между гранулами с прямым контактом с их поверхностью, однако в центральной зоне конгломерата наблюдается только врастание волокон соединительной ткани, которая заполняла все свободное пространство между ними. Аналогичные результаты отмечаются и в группах, где в качестве пластического материала были применены гранулы депротенизированной костной ткани и биокерамические гранулы на основе кораллового гидроксиапатита со сквозной пористостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихолов Р.М. Пути развития клеточных технологий в костной хирургии // Травматология и ортопедия России. 2008. (1). 65–74.
2. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. 2012. (3). 72–83.
3. Кирилова И.А., Таранов О.С., Подорожная В.Т. Изучение остеоинтеграции при имплантации экспериментальных образцов композиционных костно-керамических материалов // Хирургия позвоночника. 2014. (4). 80–87.
4. Кудяшев А.Л., Губочкин Н.Г. Оценка кровоснабжения несвободного костного аутотрансплантата при лечении больного с ложным суставом ладьевидной кости запястья (клиническое наблюдение) // Травматология и ортопедия России. 2008. (1). 59–61.
5. Рерих В.В., Аветисян А.Р., Савченко С.В. и др. Сравнительный анализ восстановления формы и прочности тел поврежденных груднопоясничных позвонков алюмооксидными биокерамическими гранулами // Хирургия позвоночника. 2014. (3). 86–94.
6. Banwart J.C., Asher M.A., Hassanein R.S. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation // Spine. 1995. 20. 1055–1060.
7. Blatter T.R., Jestaedt L., Weckbach A. Suitability of a calcium phosphate cement in osteoporotic vertebral body fracture augmentation: a controlled, randomized, clinical trial of balloon kyphoplasty comparing calcium phosphate versus polymethylmethacrylate // Spine. 2009. 34. 108–114.
8. Buck B.E., Malinin T.I., Brown M.D. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) // Clin. Orthop. Relat. Res. 1989. (240). 129–136.
9. Carter C.B., Norton M.G. Ceramics in biology and medicine // Ceramic Materials. N.Y.: Springer, 2007. 635–651.
10. Dubok V.A. Bioceramics – yesterday, today, tomorrow // Powder Metallurgy Metal Ceramics. 2000. 39. 381–384.
11. Georgy B.A. Feasibility, safety and cement leakage in vertebroplasty of osteoporotic and malignant compression fractures using ultra-viscous cement and hydraulic delivery system // Pain Physician. 2012. 15. 223–228.
12. Heo H.D., Cho Y.J., Sheen S.H. et al. Morphological changes of injected calcium phosphate cement in osteoporotic compressed vertebral bodies // Osteoporos. Int. 2009. 20. 2063–2070.
13. Liu J.T., Liao W.J., Tan W.C. et al. Balloon kyphoplasty versus vertebroplasty for treatment of osteoporotic vertebral compression fracture: a prospective, comparative, and randomized clinical study // Osteoporos. Int. 2010. 21. 359–364.
14. Minamide A., Yoshida M., Kawakami M. et al. The use of cultured bone marrow cells in type I collagen gel and porous hydroxyapatite for posterolateral lumbar spine fusion // Spine. 2005. 30. 1134–1138.
15. Rapan S., Jovanovic S., Gulan G. et al. Vertebroplasty – high viscosity cement versus low viscosity cement // Coll. Antropol. 2010. 34. 1063–1067.
16. Smucker J.D., Bobst J.A., Petersen E.B. et al. B2A peptide on ceramic granules enhance posterolateral spinal fusion in rabbits compared with autograft // Spine. 2008. 33. 1324–1329.
17. Toyone T., Tanaka T., Kato D. et al. The treatment of acute thoracolumbar burst fractures with transpedicular intracorporeal hydroxyapatite grafting following indirect reduction and pedicle screw fixation: a prospective study // Spine. 2006. 31. E208–E214.
18. Vago R. Beyond the skeleton: Cnidarian biomaterials as bioactive extracellular microenvironments for tissue engineering // Organogenesis. 2008. 4. 18–22.

19. *Wigfield C.C., Nelson R.J.* Nonautologous interbody fusion materials in cervical spine surgery: how strong is the evidence to justify their use? // *Spine*. 2001. 26. 687–694.
20. *Younger E.M., Chapman M.W.* Morbidity at bone graft donor sites // *J. Orthop. Trauma*. 1989. 3. 192–195.

COMPARATIVE ANALYSIS OF OSSEOINTEGRATION OF BIOCERAMIC ALUMOXANE CONGLOMERATE OF GRANULES

**Viktor Viktorovich RERIKH^{1,2}, Artashes Robertovich AVETISYAN¹,
Sergey Vladimirovich SAVCHENKO², Vladimir Andreevich BATAEV³,
Aelita Aleksandrovna NIKULINA³, Albert Igorevich POPELYUKH³,
Anatoly Markovich ARONOV⁴, Ekaterina Stanislavovna SEMANTSOVA⁴**

¹ *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

² *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

³ *Novosibirsk State Technical University
630073, Novosibirsk, Blyukher str., 30/1*

⁴ *JSC «NEVZ- Soyuz»*

Purpose. The trial is dedicated to the study and characterization of alumina ceramic granules conglomerate osseointegration into a large defect of spongy bone tissue. Materials and methods. The implanted materials: hollow alumina ceramic granules, porous hydroxyapatite ceramic granules and deproteinized bone granules have been investigated. The granules were implanted in vertebral bodies of 6 mongrel dogs weighing 15 to 18 kg. Results. The direct contact of newly formed bone tissue and alumina ceramic granules surface in peripheral zone of vertebral body defect have been revealed at histological examination after 6 months of follow-up period. However the connective tissue fiber ingrowing has been found in central zone of defects. Same results were observed in group with implantation of deproteinized bone granules. Unlike the previous substances the empty cavities were revealed in group with alumina bioceramic granules in case of implanting hydroxyapatite granules in the central zone of the conglomerate in two out of six cases. Conclusion. Considering the integration with bone tissue the new hollow alumina ceramic granules demonstrated the same results as the well proved in clinical practice deproteinized bone granules.

Key words: granules conglomerate, osseointegration, alumina ceramic.

Rerikh V.V. – doctor of medical sciences, head of orthopedics department, head of the chair for traumatology and orthopedics, e-mail: clinic@niito.ru

Avetisyan A.R. – postgraduate student, e-mail: avetis.med@gmail.com

Savchenko S.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for forensic pathology

Bataev V.A. – doctor of technical sciences, professor, vice chief of materials in mechanical engineering department

Nikulina A.A. – candidate of technical sciences, docent of materials in mechanical engineering department

Popelyukh A.I. – candidate of technical sciences, associate professor of department of material science in engineering

Aronov A.M. – doctor of economical sciences, executive director

Semantsova E.S. – leading researcher

О РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНЫХ СТРУКТУР В УСЛОВИЯХ ГНОЙНОГО ДЕСТРУКТИВНОГО КОКСИТА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Герман Григорьевич ДЗЮБА, Владимир Павлович КОНЕВ, Леонид Борисович РЕЗНИК,
Сергей Александрович ЕРОФЕЕВ

ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет Минздрава России
644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

Цель исследования – изучить репаративную регенерацию костной ткани в условиях деструктивного гнойного коксита при санации с использованием антибактериального спейсера. Материал и методы. Эксперименты выполнены на 15 беспородных собаках, метод исследования – световая микроскопия гистотопограмм. Результаты и обсуждение. Прослежена динамика репаративных процессов костной ткани на модели деструктивного гнойного коксита при санации воспалительного процесса с использованием артикулирующего антибактериального спейсера. Санация пораженных гнойным процессом костных структур завершается их гипертрофической остеорепарацией и окончательной перестройкой кости через 90–120 суток.

Ключевые слова: репаративная регенерация, гнойный деструктивный коксит, артикулирующий антибактериальный спейсер.

В последнее десятилетие потребность в эндопротезировании, в связи с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями крупных суставов, постоянно растет. Несмотря на эффективность и высокие реабилитационные возможности тотального эндопротезирования, сохраняется достаточно высокий риск послеоперационных осложнений. Если не считать летальности от легочной эмболии, то инфекция после тотального эндопротезирования представляет собой самое тяжелое осложнение этой операции [10] и составляет от 1,4 до 5,9 % [4, 13], а само присутствие инородного тела (эндопротеза) является условием для прогрессирования инфекционного, а значит, и деструктивного процесса. При гематогенной форме хронического остеомиелитического процесса длинных костей доказан факт возобновления репаративных процессов костных структур [5]. Однако к настоящему времени отсутствуют морфологические данные, позволяющие объективно оценить баланс воспалительных и репаративных процессов в костных структурах тазобедренного сустава при лечении хирургической инфекции различной этиологии.

Предпочтительным вариантом ортопедического лечения инфекции эндопротезированного тазобедренного сустава является применение

антибактериальных спейсеров, необходимость которых в подавлении инфекции в достаточной мере исследована и доказана [9, 11, 12]. При этом неизученным является эффективность применения спейсеров при других вариантах хирургической инфекции тазобедренного сустава с точки зрения общебиологических закономерностей, открытых Г.А. Илизаровым, и широко изученных при консолидации открытых травматических переломов трубчатых и плоских костей, лечении инфицированных ложных суставов и дефектов костей в условиях компрессионно-дистракционного остеосинтеза [3, 8].

Основной гипотезой исследования является предположение о том, что применение антибактериального артикулирующего спейсера обеспечивает купирование инфекционного процесса и превалирование восстановительных и репаративных процессов над деструктивными. Создание доказательной экспериментальной базы выдвинутого предположения представляет принципиальный интерес, является новым и актуальным.

Цель исследования – оценить возможности и изучить особенности репаративной регенерации вертлужной впадины и проксимального отдела бедренной кости в условиях деструктивного

Дзюба Г.Г. – к.м.н., доцент кафедры травматологии и ортопедии, e-mail: germanort@mail.ru

Конев В.П. – д.м.н., проф., зав. кафедрой судебной медицины с курсом правоведения

Резник Л.Б. – д.м.н., проф., зав. кафедрой травматологии и ортопедии, e-mail: leo-reznik@yandex.ru

Ерофеев С.А. – д.м.н., проф., проф. кафедры травматологии и ортопедии

гнояного коксита при санации воспалительного процесса с использованием артикулирующего антибактериального спейсера.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выполнена серия экспериментов на 15 беспородных собаках обоих полов. У всех животных получена разработанная нами экспериментальная модель гнойного коксита [6] с верифицированной клинически, лабораторно и рентгенологически деструкцией костных структур вертлужной впадины, головки и шейки бедренной кости, затем выполнялось оперативное лечение в объеме артротомии, санации проксимального отдела бедренной кости путем ее резекции на уровне базального отдела шейки, вертлужной впадины – экономной резекцией инфицированной кости с помощью остеотомов и костных фрез. Замещение удаленных костных структур выполнялось артикулирующим антибактериальным цементным спейсером [7]. Последний изготавливался интраоперационно из полиметилметакрилата (костного цемента), содержащего антибиотик (гентамицин), армировался предизогнутым стержнем типа Богданова и устанавливался в костно-мозговой канал бедренной кости цементным способом фиксации. Собаки выводились из эксперимента на 14-, 30-, 60-, 90- и 120-е сутки после санирующей операции. Исследования выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской ассоциации 2000 г., в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для гистологического исследования из вертлужной впадины и проксимального отдела бедренной кости по общепринятой методике изготавливали гистотопографические срезы толщиной 20–25 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При морфологическом исследовании через три недели после моделирования деструктивного коксита в костных структурах вертлужной впадины, головки бедренной кости отмечались очаги некроза костной ткани с выраженными воспалительными инфильтратами, преимущественно мононуклеарно-лейкоцитарными.

На 14-е сутки после санирующей операции гистологическая картина у всех животных была практически идентичной. В области локализации основного патологического инфекционного

процесса, а именно дне вертлужной впадины, компактная костная пластинка теряла монолитность и была представлена отдельными костными фрагментами, промежутки между которыми заполнялись соединительной тканью (рис. 1, а). Обнаруженные множественные костные секвестры площадью 1–2 мм² локализовались преимущественно в области постостеомиелитического дефекта (рис. 1, в). На фоне выраженной деструктивной реакции регенераторные процессы в этой области не определялись. В области костного дефекта дна вертлужной впадины гиалиновый хрящ был полностью замещен волокнистой слабо васкуляризированной соединительной тканью с неорганизованными беспорядочно ориентированными пучками волокон, в которой наблюдались очаги лейкоцитарной инфильтрации и некрозов. Особенностью гистологической картины являлась слабая васкуляризация соединительной ткани на фоне общего относительно значительного ее объема. В большом количестве определялись лишенные интимы сосуды малого калибра с атрофированным мышечным слоем и гипертрофированной адвентицией. Ряд сосудов был тромбирован. В связи с недостаточностью кровоснабжения даже в участках, находящихся в непосредственной близости от сосудов, были обнаружены некротизированные участки ткани (рис. 1, з). Гистотопографическая картина проксимального отдела бедренной кости в целом соответствовала таковой в вертлужной впадине. Порозная и утолщенная кортикальная пластинка состояла из среднеячеистой губчатой кости, в ее межтрабекулярных промежутках отмечались пустотелые полости и желатинозный костный мозг, который замещала соединительная ткань с элементами воспалительного инфильтрата (рис. 1, б). Все это указывало на угасающую воспалительную реакцию, соответствующую фазе очищения костной раны, с очень скудными и неэффективными признаками репаративной регенерации утраченных структур.

На гистотопограммах через тридцать суток после установки спейсера в области дорсальной поверхности крыши вертлужной впадины определялись наслоения периостально образованной губчатой костной ткани и сформированная компактная пластинка. В ней на фоне выраженных цементирующих линий и суженных костных каналов визуализировались в окружении рыхлой соединительной ткани полнокровные новообразованные сосуды, между которыми происходило формирование анастомозов микроциркуляторного русла. Пластинчатые трабекулы губчатой костной ткани образовывали крупнопетлистую сеть с кроветворно-жировым костным мозгом. На их поверхности определялись множествен-

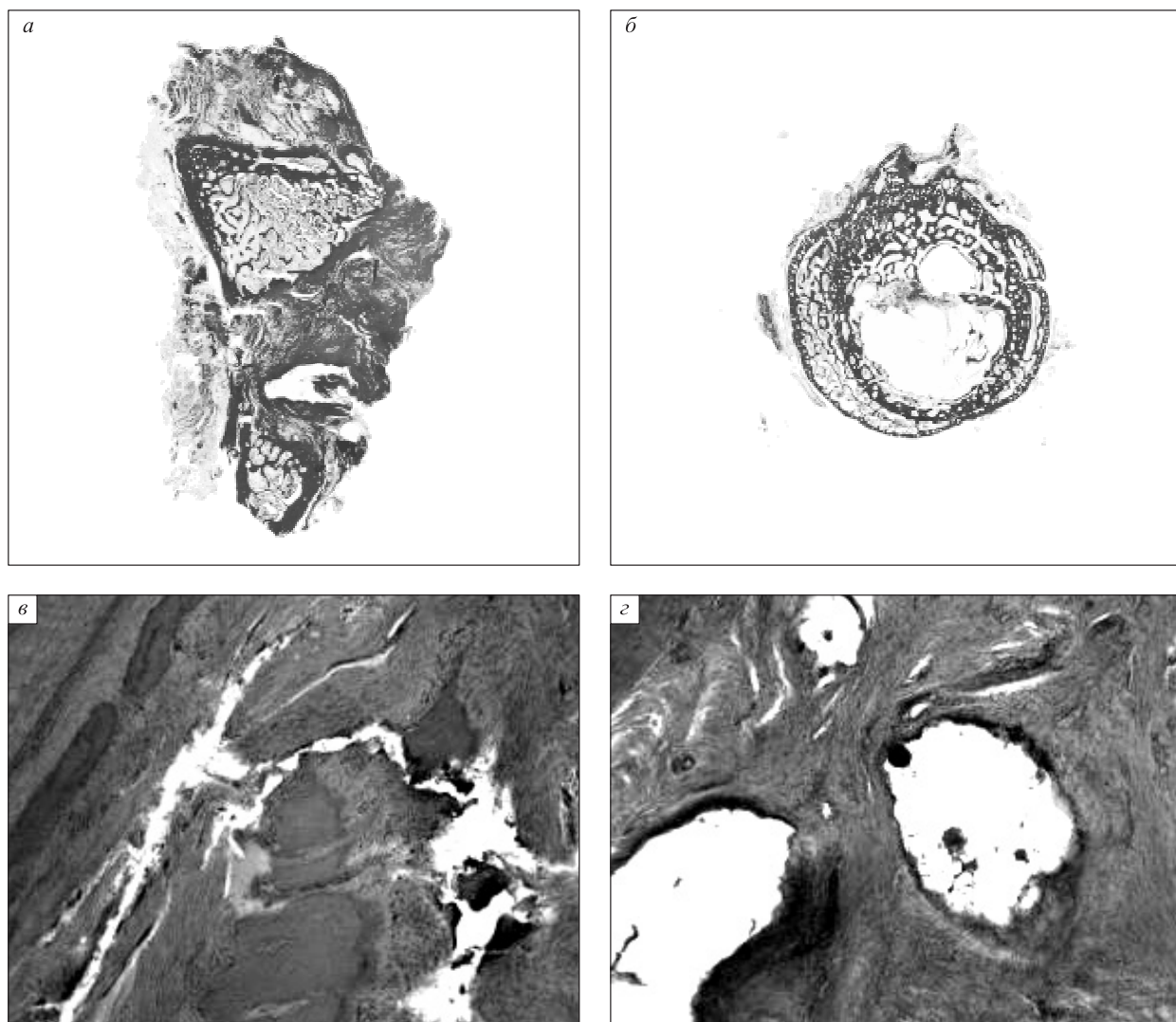


Рис. 1. Гистотопографическая и морфологическая картина костных структур на 14-е сутки после санитрующей операции: сканограмма гистотопографического препарата вертлужной впадины (аксиальный срез) (а) и проксимального отдела бедренной кости (поперечный срез) (б), фрагменты компактной пластинки дна вертлужной впадины с костными секвестрами и разрастанием соединительной ткани (в), патологически измененные сосуды разных калибров, очаги периваскулярных некрозов (z); а, б – сканограммы гистотопографических целлоидиновых срезов, окраска по Ван-Гизону, ув. 1,5х; в, z – целлоидиновый срез, окраска гематоксилином и эозином, об. 10х, ок. 10х

ные остеобласты. Гиалиновый хрящ в суставной выстилке на значительном протяжении был замещен соединительной тканью. На препаратах проксимального отдела бедренной кости к этому сроку отмечалось истончение кортикальной пластинки, представленной крупноячеистой трабекулярной сетью обычного строения. Изменения в надкостнице свидетельствовали об активации регенеративных процессов. Она была значительно утолщена, на отдельных участках отмечалось не только утолщение наружного фиброзного слоя, но и многорядное строение камбиального. В наружном слое наблюдалось увеличение содержания сосудов микроциркуляторного типа.

К 60-м суткам эксперимента процессы репаративного остеогенеза проявлялись все отчетливее. В средней части вертлужной впадины определялось ее типическое строение. В дорсальном и вентральном отделах впадины располагалось губчатое костное вещество. На месте дефекта дна вертлужной впадины наблюдалась новообразованная костная ткань крупноячеистой формации с утолщенной наружной и истонченной внутренней кортикальной пластинками (рис. 2, а). В нагружаемых контактных со спейсером отделах (дно и крыша) отмечался оживленный остеогенез. Пластинчатые костные трабекулы были покрыты слоем активных остеобластов, формирую-

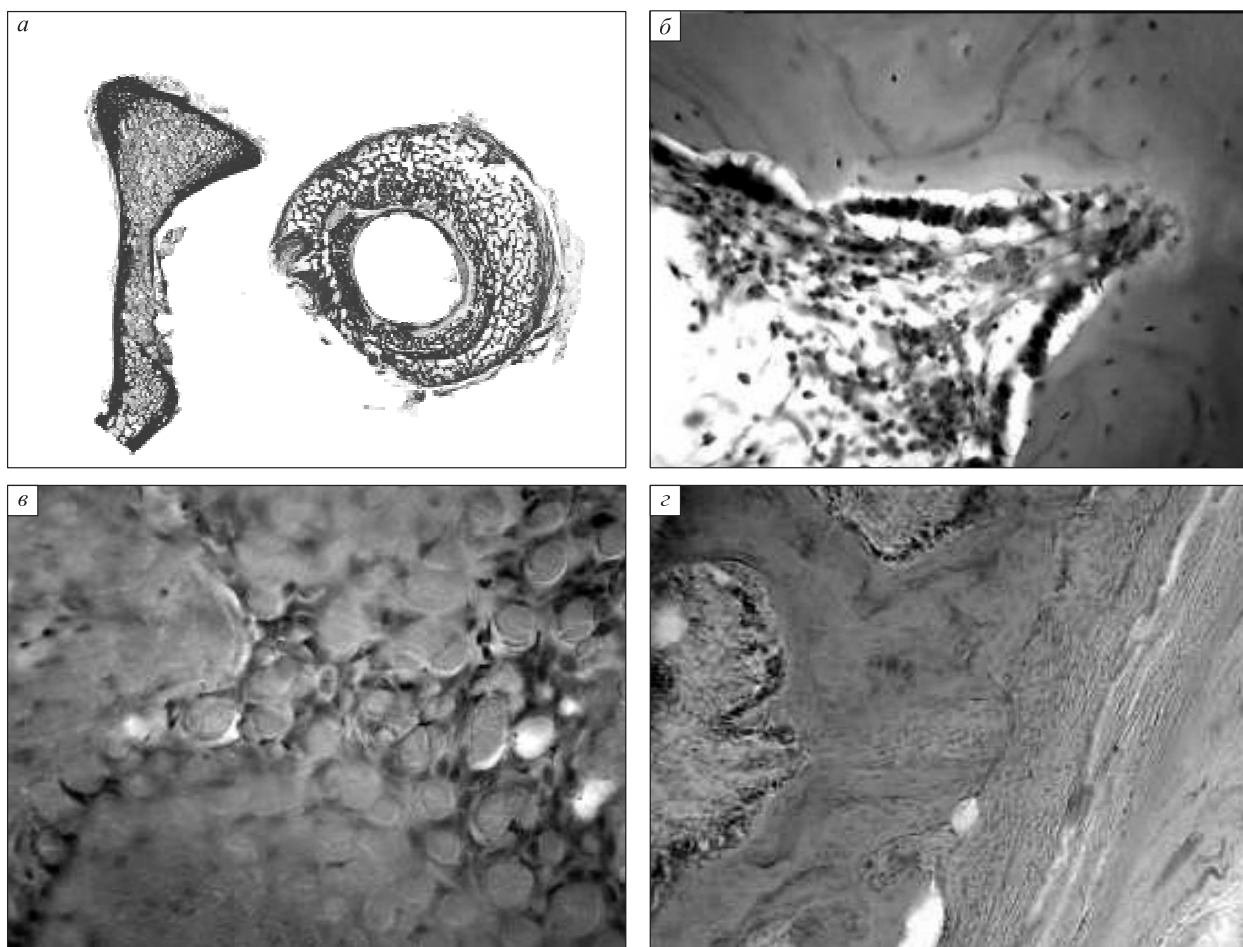


Рис. 2. Гистотопографическая и морфологическая картина костных структур на 60-е сутки после санитизирующей операции: сканограмма гистотопографического препарата вертебральной впадины (аксиальный срез) и проксимального отдела бедренной кости (поперечный срез) (а), пучковая костная ткань в составе новообразованной трабекулы (б, в), трехслойная структура кортикальной пластинки (г); а – сканограммы гистотопографических целлоидиновых срезов, окраска по Ван-Гизону, ув. 1,5×; б, в – целлоидиновый срез, окраска гематоксилином и эозином, об. 40×, ок. 10×; г – целлоидиновый срез, окраска гематоксилином и эозином, об. 10×, ок. 10×

щих новообразованную костную ткань (рис. 2, б). Вместе с тем в отдельных областях наблюдались процессы ремоделирования с активизацией клеток остеокластического ряда. Достоверным подтверждением активизации остеорепаративных процессов явилось обнаружение в новообразованных экзофитах крыши вертебральной впадины множественных пучковых трабекул, из-за чего кость приобретала неровный фестончатый контур (рис. 2, в). Возникновение подобных трабекул главным образом характерно для незрелой костной ткани, формируемой индуцибельными и детерминированными остеогенными стромальными клетками и встречается в эмбриональном развитии костной ткани и при дистракционном остеогенезе [1, 2].

Кровоснабжение регенерирующих структур поддерживалось на прежнем высоком уровне,

кровенаполнение синусоидов костного мозга уже в эти сроки практически не отличалось от нормы. В проксимальной (вертельной области) и особенно в области диафиза бедренной кости отмечали значительное увеличение толщины кортикальной пластинки. При средних и больших увеличениях визуализировалось трехслойное строение корковой пластинки. Первый слой, приближенный к эндостальной поверхности, состоял из компактно организованной кости, имеющей остеонное строение и сформированной в основном из пластинчатой костной ткани. Второй слой, приближенный к наружной поверхности, выглядел как тонкий слой компактизирующейся губчатой кости мелкоячеистого строения, образующийся клетками надкостницы. И, наконец, третий слой, занимающий между ними промежуточное положение, был образован сетью костных трабекул

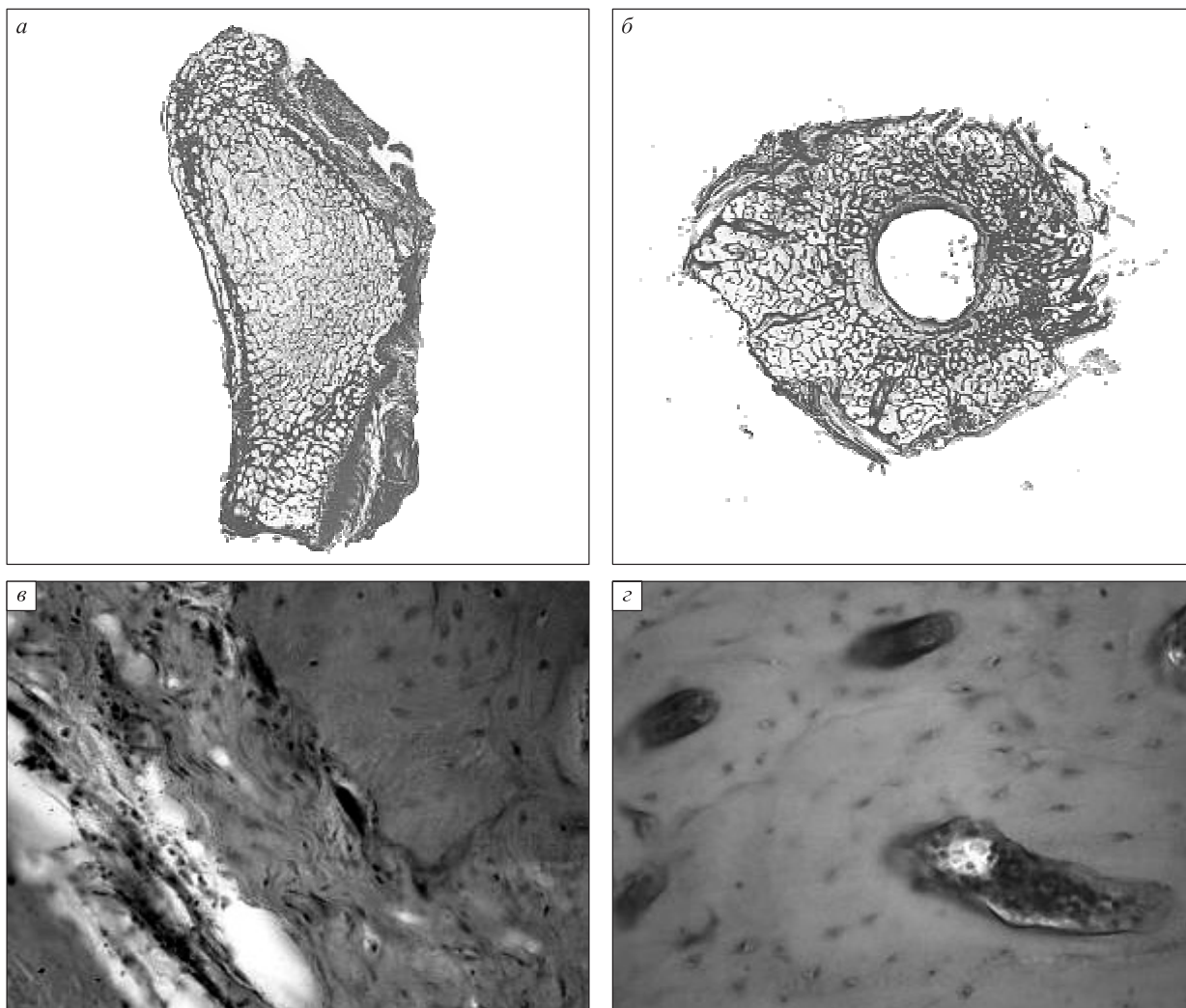


Рис. 3. Гистотопографическая и морфологическая картина костных структур на 120-е сутки после санирующей операции: сканограммы гистотопографических препаратов вертлужной впадины (аксиальный срез) (а) и проксимального отдела бедренной кости (поперечный срез) (б), пластинчатая костная трабекула с уплотненными неактивными остеобластами и единичными остеокластами (в), остеонное строение компактной костной ткани дна вертлужной впадины с сосудистыми каналами и тонкостенными микрососудами (з); а, б – сканограммы гистотопографических целлоидиновых срезов, окраска по Ван-Гизону, ув. 1,5×; в, з – целлоидиновый срез, окраска гематоксилином и эозином, об. 10×, ок. 10×

с содержанием желатинозного костного мозга в межтрабекулярных промежутках. Такое строение характерно для кортикальной пластинки в период ремиссии остеомиелита длинных костей (рис. 2, з).

Через 90 суток вновь образованные и предшествующие структуры вертлужной впадины имели очень близкое, практически одинаковое строение и плотность. Массивные пластинчатые трабекулы формировали мелкопетлистую сеть, на их поверхности продолжали обнаруживаться очаги активного остеогенеза и остеокластической резорбции. Увеличение массы костных трабекул свидетельствовало о преобладании остеорепаративных процессов преимущественно в наиболее

нагружаемых отделах крыши вертлужной впадины. В области дна вертлужной впадины обнаруживались участки, образованные компактной костной тканью типичного остеонного строения. Узкие сосудистые каналы содержали рыхлую соединительную ткань с 1–2 микрососудами. На фоне уменьшения малодифференцированных структур соединительной ткани в некоторых отделах дна вертлужной впадины суставную выстилку формировал спаянный с окружающей тканью волокнистый хрящ. Проксимальный отдел бедренной кости выглядел необычно гипертрофированным. Кортикальная пластинка, представленная разреженной трабекулярной сетью, была значительно утолщена за счет активного форми-

рования костной ткани со стороны периоста, что объяснялось повышенной остеогенной активностью ее камбиального слоя.

Гистологическая картина костных структур вертлужной впадины и проксимального отдела бедренной кости к 120-м суткам после установки спейсера в целом характеризовалась завершением остеорепаративных процессов. Суставная ямка была заполнена новообразованной трабекулярной костной тканью (рис. 3, а). Массивные пластинчатые костные трабекулы образовали крупнопетлистую сеть с жировым костным мозгом в межтрабекулярных промежутках. Новообразованная трабекулярная сеть была уплотнена в медиальной части и разрежена в латеральной порции костного вещества. Компактная костная пластинка дна вертлужной впадины спонгизировалась, на ее периостальной поверхности были резорбционные лакуны и прикрепленные остеокласты. На поверхности костных трабекул располагались единичные остеокласты и уплощенные остеобласты, что свидетельствовало о завершении перестроечного процесса (рис. 3, в). К этому сроку структурировалось кровообращение новообразованных костных тканей: кровенаполнение синусоидов, сосудов артериального и венозного типов возвратилось в пределы функциональной нормы. Оболочки артерий приобрели обычный характер, хотя некоторые оставались утолщенными (рис. 3, г). На поперечных срезах бедренной кости были отмечены увеличение толщины и разреженность костного вещества корковой пластинки, которая имела фестончатый край со стороны периоста (рис. 3, б). Периостальная поверхность коркового слоя бедренной кости была представлена редкой трабекулярной сетью тонких трабекул сфероидальной формы. Межтрабекулярные промежутки заполнял в основном кровотворно-жировой костный мозг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученной морфологической картины структур вертлужной впадины и проксимального отдела бедренной кости, деструктивно измененных вследствие гнойного коксита, позволяет сделать ряд выводов о стадийности заключительного (репаративного) периода инфекционного процесса при лечении с использованием артикулирующих спейсеров. В первые две недели после санирующей операции наблюдался регресс инфекционного процесса, без выраженных лейкоцитарных инфильтратов. Никаких признаков репаративного остеогенеза и хондрогенеза в эти сроки обнаружено не было. Сформированные

костные полости были заполнены рыхлой неорганизованной соединительной тканью. Суставной хрящ почти на всей площади был утрачен и замещался волокнистой соединительной тканью с неорганизованными беспорядочно ориентированными пучками волокон. Специфичностью соединительнотканых структур явилась их слабая васкуляризация, что расценивалось как проявление заключительной стадии очищения костной раны.

К 30-м суткам морфологическая картина претерпела существенные изменения, которые можно было характеризовать двумя основными особенностями: полным купированием признаков инфекционного процесса в вертлужной впадине и проксимальном отделе бедренной кости; восстановлением и даже улучшением кровоснабжения в зоне постостеомиелитических дефектов во всех исследуемых тканях. В соединительной ткани, заполняющей большинство костных дефектов, формировалась обширная сосудистая сеть, состоящая из разнокалиберных сосудов, с формированием многочисленных микроанастомозов, в связи с чем соединительная ткань начинала перестраиваться и структурироваться. Наблюдалось восстановление кровенаполнения синусоидов костного мозга, инвазия капиллярных сосудов в зону остеохондрального соединения, появлялась системная васкуляризация надкостницы, в компактной костной ткани визуализировались новообразованные сосуды микроциркуляторного русла. Следствием такой динамики роста микроциркуляторного звена явилась активизация репаративных процессов, выражающаяся в миграции и появлении на поверхности костных трабекул множества активных остеобластов, начинающемся восстановлении компактной костной пластинки в области дна вертлужной впадины и периостальном новообразовании губчатой кости.

Еще более оживленный остеогенез выявлялся на 60-е сутки после санирующей операции: пластинчатые костные трабекулы вертлужной впадины были покрыты слоем активных остеобластов, вместе с тем появление клеток остеокластического ряда знаменовало начало перехода к процессу ремоделирования костных структур. В эти сроки уже наблюдалось восстановление утраченных элементов вертлужной впадины и кортикальных элементов проксимального отдела бедренной кости. Выявление в составе новообразованных трабекул пучковой костной ткани сближало обнаруженные процессы с эмбриональным и дистракционным остеогенезом, но с совершенно иным индуктором этого процесса. Вероятным механизмом стимуляции дифференциации мезенхималь-

ных клеток в остеобластическом направлении являлись механическое раздражение и возникающая компрессия между спейсером и вертлужной впадиной на фоне повышенной вследствие активного ангиогенеза концентрации кислорода.

В трехмесячный срок после санации гистопографически вертлужная впадина приобретала необычно гипертрофическую форму со значительным увеличением массива новообразованной трабекулярной костной ткани, что убедительно свидетельствовало о преобладании репаративных процессов. Гистологически вновь образованные и предшествующие структуры приобретали очень близкое, практически одинаковое строение и плотность, что указывало на завершение процесса ремоделирования кости. Еще более гипертрофированными выглядели структуры проксимального отдела бедренной кости, наружный диаметр которой был увеличен в 1,5–2 раза. Дополнительной причиной этого феномена являлся развивающийся в эти сроки синдром stress-shielding.

К 120-м суткам репаративные процессы стихали, что объяснялось окончательным структурированием микрососудистого русла. Костные ткани приобретали типичное остеонное строение, в суставной выстилке вертлужной впадины соединительная ткань замещалась волокнистым хрящом, организованным более примитивно, чем гиалиновый.

ВЫВОДЫ

1. Результатом изучения динамики остеогенеза в условиях деструктивного гнойного коксита при санации инфекционного очага с применением артикулирующего антибактериального спейсера являются новые знания о течении репаративных процессов.

2. Особенностью течения инфекционного процесса в костных структурах при применении артикулирующего спейсера является этапность, заключающаяся в неизбежном прохождении стадий резорбции, васкуляризации, репаративной регенерации и окончательной перестройки кости. Благоприятным завершением инфекционного процесса является органотипическое восстановление вертлужной впадины в срок 90–120 суток после санирующей операции.

3. Одним из главных условий санации и индуктором репарации может являться внешний раздражитель, обеспечивающий артикуляцию и оптимальное распределение нагрузки на вертлужную впадину. В качестве такого индуктора может служить артикулирующий антибактериальный спейсер, его применение является обо-

снованным и с точки зрения эффективной санации скомпроментированных костных структур, и с точки зрения оптимизации и «правильного» завершения течения раневого процесса.

4. Полученные экспериментальные данные указывают, что обоснованным сроком выполнения следующего ортопедического этапа лечения – окончательного ревизионного эндопротезирования – можно считать период от 90-х до 120-х суток после санирующей операции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гололобов В.Г., Деев Р.В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // Морфология. 2003. 123. (1). 9–19.
2. Ирьянов Ю.М. Репаративное костеобразование в условиях дистракционного остеосинтеза: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Иркутск, 1996.
3. Ключин Н.М., Аранович А.М., Шляхов В.И. и др. Новые технологии лечения больных хроническим остеомиелитом – итог 40-летнего опыта применения метода чрескостного остеосинтеза // Гений ортопедии. 2011. (2). 32–38.
4. Лю Бо, Тихилов Р.М., Шубняков И.И. и др. Эффективность первого этапа двухэтапной ревизии при параэндопротезной инфекции тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2014. (3). 5–14.
5. Никитин Г.Д., Рак А.В., Линник С.А. и др. Хирургическое лечение остеомиелита. СПб., 2000. 288 с.
6. Пат. № 2494468 РФ. Способ моделирования острого гнойного деструктивного коксита у лабораторных животных / Г.Г. Дзюба, С.А. Ерофеев, Ю.В. Чернигов и др.; опубл. 27.09.2013.
7. Пат. № 138352 РФ. Однокомпонентный цементный антибактериальный спейсер тазобедренного сустава / Ю.В. Чернигов, С.Ю. Чернигов, С.В. Чернигова и др.; опубл. 10.03.2014.
8. Шевцов В.И., Макушин В.Д., Куфтырев Л.М. Дефекты костей нижней конечности. Чрескостный остеосинтез по методикам Российского научного центра «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова. Курган, 1996. 504 с.
9. Ben-Lulu O., Farno A., Gross A.E. et al. A modified cement spacer technique for infected total hip arthroplasties with significant bone loss // J. Arthroplasty. 2012. 27. (4). 613–619.
10. Dale H., Hallan G., Espehaug B. et al. Increasing risk of revision due to deep infection after hip arthroplasty // Acta Orthop. 2009. 80. (6). 639–645.
11. Hsieh P.H., Huang K.C., Tai C.L. Liquid gentamicin in bone cement spacers: in vivo antibiotic release and systemic safety in two-stage revision of infected hip arthroplasty // J. Trauma. 2009. 66. (3). 804–808.

12. Parvizi J., Saleh K.J., Ragland P.S. et al. Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement // Acta Orthop. 2008. 79. 335–341.

13. Phillips J.E., Crane T.P., Noy M. et al. The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey // J. Bone Joint Surg. 2006. 88. 943–948.

ON REPARATIVE REGENERATION OF BONE STRUCTURES IN CONDITIONS OF PURULENT DESTRUCTIVE COXITIS (EXPERIMENTAL STUDY)

German Grigor'evich DZYUBA, Vladimir Pavlovich KONEV, Leonid Borisovich REZNIK, Sergey Aleksandrovich EROFEEV

*Omsk State Medical University
644099, Omsk, Lenin str., 12*

Aim: to study the reparative regeneration of bone tissue in conditions of destructive purulent coxitis in rehabilitation with the use of antibacterial spacer. **Material and methods.** The experiments were performed on 15 mongrel dogs, research method was the light microscopy of histotopography. **Results and discussion.** The dynamics of reparative processes of osseous tissue has been observed in the model of destructive purulent coxitis at inflammatory process sanitation using articulating antibiotic spacer. The rehabilitation of the osseous structures affected by purulent process is completed with their hypertrophic osteoreparation and final bone restructuring through 90–120 days.

Key words: reparative regeneration, purulent destructive coxitis, articulating antibiotic spacer.

Dzyuba G.G. – candidate of medical science, assistant professor of traumatology and orthopedy,
e-mail: germanort@mail

Konev V.P. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of forensic medicine with jurisprudence course

Resnik L.B. – doctor of medical Sciences, professor, head of the department of traumatology and orthopedy,
e-mail: leo-reznik@yandex.ru

Erofeev S.A. – doctor of medical sciences, professor, professor of the department of traumatology and orthopedy

ВЛИЯНИЕ ИНДУКЦИИ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ Keap1/Nrf2/ARE НА КЛАССИЧЕСКУЮ АКТИВАЦИЮ МАКРОФАГОВ

Петр Михайлович КОЖИН¹, Николай Константинович ЗЕНКОВ¹,
Анна Евгеньевна ЛЕМЗА¹, Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ¹,
Наталья Сергеевна ЗАЙЦЕВА¹, Наталья Валерьевна КАНДАЛИНЦЕВА²,
Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА¹

¹ НИИ экспериментальной и клинической медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

С целью исследования влияния фенольного антиоксиданта 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфата натрия (ТС-13), активирующего редокс-чувствительную систему Keap1/Nrf2/ARE, на классическую поляризацию макрофагов изучено его действие на экспрессию костимулирующей молекулы CD86 и продукцию оксида азота NO^{*}. Установлено, что ТС-13 в отсутствие дополнительного праймирования IFN γ и LPS, а также в низких концентрациях в присутствии IFN γ и LPS угнетает экспрессию перитонеальными макрофагами мышей BALB/c поверхностного антигена CD86. Высокие концентрации (100 мкМ) ТС-13 оказывают синергичный эффект с индукторами классической активации и бактериальными агентами (БЦЖ), увеличивая экспрессию костимулирующих молекул. При этом ТС-13 дозозависимо стимулирует продукцию NO^{*} макрофагами вне зависимости от дополнительной стимуляции IFN γ + LPS или БЦЖ. Полученные данные свидетельствуют, что индукция системы Keap1/Nrf2/ARE, активирующей механизмы защиты от агрессивных воздействий (в том числе изменение редокс-статуса), может как ингибировать, так и усиливать активацию макрофагов по классическому пути.

Ключевые слова: сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE, ТС-13, поляризация макрофагов, CD86, оксид азота.

Макрофаги проявляют значительную пластичность в своих физиологических реакциях, и на их фенотип существенно влияет состояние окружающей ткани. Взаимодействие с цитокинами 1 типа (IFN γ , TNF- α , ИЛ-1 α и др.), а также с бактериями или низкими концентрациями бактериальных липополисахаридов (LPS) поляризует макрофаги, переводя их в так называемое состояние классической активации (M1), или провоспалительное, «состояние битвы» [1, 3, 26]. При этом M1-макрофаги демонстрируют высокие уровни

фагоцитоза и продукции оксида азота (NO^{*}) из L-аргинина, а также других активированных кислородных метаболитов (АКМ), экспрессируют на цитоплазматической мембране большое количество костимулирующих молекул и играют решающую роль в разрешении бактериальных инфекций посредством фагоцитоза и убийства патогенов, инициации и поддержания воспаления, рекрутирования таких клеток-эффекторов приобретенного иммунитета, как Т-лимфоциты [10, 24]. Напротив, цитокины 2 типа, такие как

Кожин П.М. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: kozhinpm@gmail.com

Зенков Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru

Лемза А.Е. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemza.ae@yandex.ru

Чечушков А.В. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: achechushkov@gmail.com

Зайцева Н.С. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: nszaitseva@gmail.com

Кандалинцева Н.В. – к.х.н., директор Института естественных и социально-экономических наук, e-mail: aquarphenol@mail.ru

Меньщикова Е.Б. – д.м.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru

ИЛ-4 и ИЛ-13, переводят макрофаги в состояние M2, отличное от состояния M1 по характеру рецепторного аппарата, метаболическим и секреторным параметрам и условно называемое противовоспалительным (альтернативная активация, «состояние ремонта») [1, 26]. M2-макрофаги связывают с фиброзом и характеризуют по экспрессии и активности аргиназы, которая расщепляет L-аргинин до мочевины и L-орнитина, предшественника образования коллагена¹ [13]. Для альтернативно активированных макрофагов также характерны высокие уровни экспрессии CD206, CD36 и низкие уровни экспрессии костимулирующих молекул, таких как CD40 и CD86 [10]. M2-макрофаги играют важную роль в ограничении деструкции тканей хозяина при хронических инфекциях [1, 24].

В ходе борьбы с патогенами макрофаги формируют токсическое окружение, во многом неспецифическое (в особенности это касается АКМ), и наличие механизмов самозащиты способствует повышению их жизнеспособности. К числу главных регуляторных и защитных систем клетки относится сигнальная система антиоксидант-рецептивного элемента (ARE). В ее состав входит транскрипционный фактор Nrf2, образующий комплекс с ингибитором Keap1, ключевую роль в стабильности этого комплекса играют процессы окислительной/электрофильной модификации SH-групп остатков цистеина Keap1. В транскрипционно активной форме Nrf2 связывается с последовательностью ARE, в биологически функциональной форме входящей в промоторы более 500 генов [22], кодируемые ими ферменты участвуют в антиоксидантной защите и в детоксикации ксенобиотиков. С одной стороны, такая активация системы Keap1/Nrf2/ARE необходима для выживания макрофагов [12], а с другой стороны, по данным ряда авторов, инициирует их переключение из провоспалительного (M1) в противовоспалительное состояние (M2), тем самым запуская процессы репарации [10, 28]. Роль Nrf2 продемонстрирована для многих заболеваний, для которых характерно нарушение функции макрофагов [27, 30, 39]. В то же время существует много противоречивых данных относительно участия Nrf2-зависимых процессов в изменении фенотипа клеток макрофагального ряда, а также их координации с другими регулирующими воспалением редокс-чувствительными сигнальными системами (опосредованными транскрипционными факторами NF-κB, PPARγ, AP-1 и др.). Например, показано, что в определенных условиях

от активности Nrf2 напрямую зависит фагоцитарная активность макрофагов, что позволяет им более эффективно бороться с бактериальными агентами в острой фазе воспаления [14]; при таком хроническом воспалительном заболевании, как атеросклероз, Nrf2 может стимулировать как классическую, так и альтернативную активацию макрофагов, не говоря уже о других фенотипических паттернах [27]; АКМ, увеличение продукции которых служит одним из признаков M1-поляризации и индуцирует сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, в определенных условиях потенцируют M2-поляризацию [40].

Ранее нами показано, что оригинальный водорастворимый синтетический фенол 3-(3'-метилбутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13) эффективно подавляет воспаление в острой фазе [25] и способствует ограничению микобактериального гранулематозного воспаления [5], что обусловлено не только его прямым антиоксидантным действием, но и способностью индуцировать систему Keap1/Nrf2/ARE [4]. Целью настоящего исследования послужило изучение влияния ТС-13 на маркеры классической активации макрофагов и способности соединения модулировать M1-поляризацию.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ТС-13 синтезирован в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск), как описано ранее [6].

Исследования проведены на клетках перитонеального экссудата мышей линии BALB/c. Животных выводили из эксперимента декапитацией, в брюшную полость вводили 10 мл холодной культуральной среды RPMI-1640, через 2 мин культуральную среду, содержащую клетки перитонеального экссудата, извлекали при помощи шприца. Полученную таким образом суспензию клеток центрифугировали (10 мин, 1000 об./мин), осадок ресуспендировали в полной культуральной среде, приготовленной на основе DMEM/F12, с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 1 % пенициллина, 1 % стрептомицина, 1 % глутамина. Клетки засеивали в лунки 6-луночного планшета по 400 тыс. на лунку в объеме 500 мкл. Через 2 ч инкубирования (+37 °C, 5 % CO₂) неприлипающую фракцию удаляли двукратной отмыжкой средой DMEM/F12. Полученную таким образом адгезионную фракцию клеток перитонеального экссудата, преимущественно содержащую макрофаги (определяемые по морфологическим признакам),

¹ Трудно представить более элегантный и простой механизм для переключения макрофага с «битвы» на «ремонт», чем такая «аргининовая развилка» [26].

инкубировали в течение 24 ч в полной культуральной среде с добавлением в зависимости от цели эксперимента LPS + IFN γ (100 и 20 нг/мл соответственно), вакцины БЦЖ (в соотношении бактерия/макрофаг 3:1), ТС-13 (20 или 100 мкМ, отдельно или совместно с LPS + IFN γ , вакциной БЦЖ). Для исследования экспрессии поверхностных антигенов или продукции NO \cdot клетки трижды промывали раствором Версена, оставляли в нем на 10 мин, затем механически ресуспендировали, центрифугировали (5 мин, 1000 об./мин), удаляли супернатант.

Для блокирования неспецифического связывания перитонеальные макрофаги ресуспендировали в 0,5%-м растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в натрий-фосфатном буфере (PBS), через 30 мин инкубирования центрифугировали (5 мин, 1000 об./мин) и ресуспендировали в 100 мкл 0,5%-го раствора BSA в PBS, содержащего конъюгированные с флуоресцеин-изотиоцианатом антитела к CD86 (eBioscience № 11-0862-81, США), инкубировали 30 мин при 4 °С. Затем клетки отмывали от избытка антител центрифугированием (5 мин, 1000 об./мин), удаляли супернатант и ресуспендировали в 200 мкл PBS. Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton-Dickinson, США), результаты выражали в относительных единицах, нормированных на контроль. Продукцию NO \cdot определяли с помощью красителя 4-амино-5-метиламино-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (DAF-FM-DA, LifeTechnologies № D23842, США), который при попадании в клетку под воздействием эстераз преобразуется в DAF-FM, интенсивно флуоресцирующий при взаимодействии с NO \cdot . Перитонеальные макрофаги инкубировали 30 мин при 4 °С в растворе Хенкса, содержащего 5 мкМ DAF-FM-DA, затем отмывали от избытка красителя центрифугированием (5 мин, 1000 об./мин), удаляли супернатант, ресуспендировали в 200 мкл раствора Хенкса и дополнительно инкубировали 15 мин для завершения деэстерификации. Интенсивность DAF-FM-зависимой флуоресценции

($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ нм}$) измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Поскольку распределение величин в выборках отличалось от нормального, данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_1 – Q_3), различия между группами оценивали с помощью дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Связь между признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r) либо применяли нелинейные модели регрессии с последующим их дисперсионным анализом и определением достоверности аппроксимации с помощью критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия костимулирующей молекулы CD86, маркера поляризации макрофагов по классическому пути, прогнозируемо увеличивалась в результате 24-часового культивирования перитонеальных макрофагов с индукторами М1-поляризации LPS + IFN γ (табл. 1). Под влиянием ТС-13 без дополнительного праймирования LPS + IFN γ экспрессия CD86 снижалась. При инкубировании с LPS + IFN γ наблюдалась концентрационная инверсия эффекта ТС-13: если в низких концентрациях соединение снижало экспрессию CD86 либо значимо (5 мкМ; Me (Q_1 – Q_3) 0,80 (0,78–0,82) усл. ед), либо на уровне тенденции (20 мкМ, табл. 1), то в высокой концентрации (100 мкМ) ТС-13 значительно повышал величину показателя (см. табл. 1), при этом зависимость от дозы имела вид гауссовой кривой ($R = 0,946$, критерий Фишера $F = 531,07$, $p = 0,0000$; рис. 1, а). Культивирование перитонеальных макрофагов с БЦЖ сопровождалось значимым повышением экспрессии поверхностного антигена CD86 (см. табл. 1). Дополнительное введение в среду инкубирования ТС-13 в концентрации 20 мкМ не изменяло величину показателя, в то время как в дозе 100 мкМ ТС-13 существенно увеличивал экспрессию костимулирующей молекулы (см. табл. 1), зависимость от концентрации была

Таблица 1

Экспрессия CD86 перитонеальными макрофагами мышей BALB/c, усл. ед. (Me (Q_1 – Q_3))

Условия инкубирования	Концентрация ТС-13 в среде инкубирования		
	0 мкМ	20 мкМ	100 мкМ
Контроль	0,97 (0,93–1,05)	0,88* (0,87–0,91)	0,85* (0,78–0,89)
LPS + IFN γ (100 + 20 нг/мл)	1,10* (1,06–1,14)	1,05 (0,88–1,20)	1,88* [#] (1,74–1,99)
Вакцина БЦЖ (3:1)	1,46* (1,43–1,53)	1,49* (1,46–1,50)	3,24* [†] (3,05–3,44)

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – в контроле, # – при инкубировании с LPS + IFN γ , † – при инкубировании с вакциной БЦЖ.

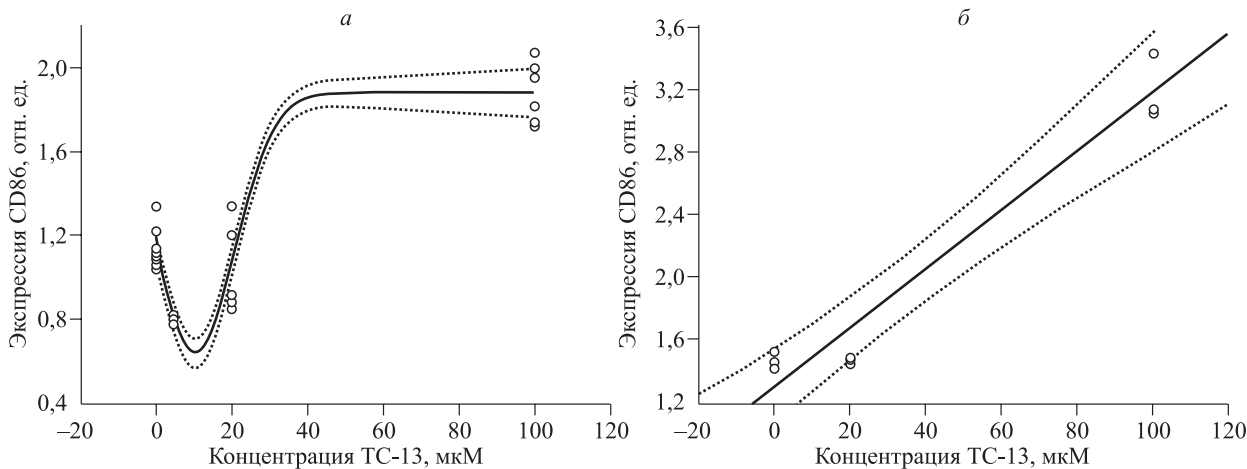


Рис. 1. Зависимость экспрессии макрофагами CD86 от концентрации ТС-13 при инкубировании в присутствии LPS + IFN γ (а) или вакцины БЦЖ (б) (диаграмма рассеяния). Здесь и на рис. 2 кружки – отдельные значения, сплошная линия – линейная аппроксимация, пунктирная – 95%-й доверительный интервал

линейной и достоверной ($r_s = 0,968, p = 0,0001$; рис. 1, б).

Под действием индукторов М1-поляризации LPS + IFN γ значимо усиливалась продукция маркера классической активации макрофагов оксида азота (табл. 2). Воздействие ТС-13 дозозависимо увеличивало генерацию NO $^{\bullet}$ перитонеальными макрофагами вне зависимости от праймирования LPS и IFN γ ($r_s = 0,906, p = 0,0000$ и $r_s = 0,716,$

$p = 0,0027$ соответственно; рис. 2, а, б). В то же время синтез NO $^{\bullet}$, существенно повышенный при наличии в среде инкубирования вакцины БЦЖ, при дополнительном введении ТС-13 снижался (20 мкМ) либо не изменялся (100 мкМ) (см. табл. 2).

Экспрессия костимулирующих молекул регулируется внутриклеточным редокс-балансом, NF- κ B-, MAPK-сигнальными путями и активно-

Таблица 2

Продукция NO $^{\bullet}$ перитонеальными макрофагами мышей BALB/c, усл. ед. (Ме (Q1–Q3))

Условия инкубирования	Концентрация ТС-13 в среде инкубирования		
	0 мкМ	20 мкМ	100 мкМ
Контроль	1,04 (0,92–1,06)	1,61* (1,59–1,71)	2,16* (2,00–2,49)
LPS + IFN γ (100 + 20 нг/мл)	1,32* (1,22–1,34)	1,48*# (1,35–1,60)	2,03*# (1,76–2,36)
Вакцина БЦЖ (3:1)	2,10* (1,98–2,23)	1,51*† (1,45–1,57)	1,93* (1,56–2,44)

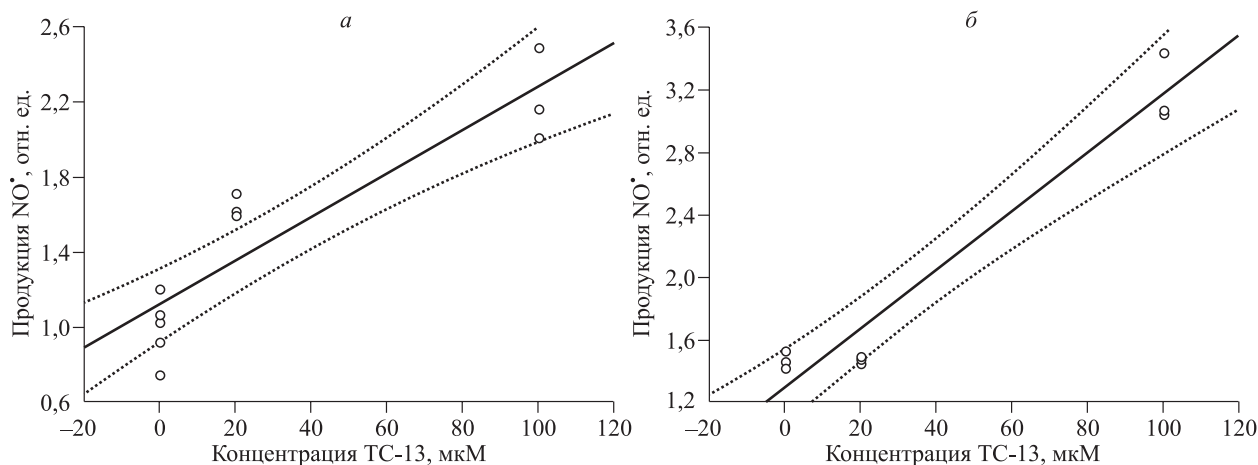


Рис. 2. Зависимость продукции макрофагами NO $^{\bullet}$ от концентрации ТС-13 при инкубировании в присутствии (а) или в отсутствие LPS + IFN γ (б) (диаграмма рассеяния)

стью гистондеацетилазы; увеличение экспрессии CD86 связано как с продукцией АКМ, так и с активностью системы Keap1/Nrf2/ARE [3, 8, 32]. Соединения, активирующие Nrf2-зависимый сигнальный путь, весьма разнообразны, но одной из их общих характеристик является способность модифицировать сульфгидрильные группы остатков цистеина, поэтому основное внимание исследователей направлено на влияние индукторов ARE на взаимодействие между полицистеиновым сенсором Keap1 и Nrf2, от которого зависит транскрипционная активность последнего [15, 34]. С другой стороны, множество исследований показали, что помимо АКМ-опосредованной модификации ингибиторного белка Keap1, индукторы ARE влияют и на сигнальные каскады, участвующие в регуляции Nrf2. Например, структурно схожий с TC-13 *трет*-бутилгидрохинон активирует PI3K/Akt-сигнальный путь [23], куркумин – путь, зависящий от MAP-киназ (p38, JNK, ERK) [9]. Одним из эффекторов этих сигнальных путей является киназа гликогенсинтазы 3 (GSK-3), которая может интегрировать их влияние на Nrf2 при Keap1-независимой активации [33]. GSK-3 фосфорилирует Nrf2, вследствие чего усиливается экспорт транскрипционного фактора из ядра и, соответственно, уменьшается транскрипция Nrf2-зависимых генов. Активация PI3K/Akt- и/или MAPK-сигнальных путей приводит к фосфорилированию самой GSK-3, снижению ее активности и, следовательно, увеличению активности Nrf2 [36, 37].

Макрофаги вовлечены во множество важных функций организма, включая защиту от инфекционных агентов, тканевый гомеостаз, репарацию, разрешение воспаления. Интерфероны второго типа (IFN γ), секретируемые Т-хелперами первого типа и НК-клетками, являются одними из главных активаторов макрофагов [21]. IFN γ , связываясь со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране, инициирует JAK1/JAK2/STAT1-сигнальный каскад, что в итоге приводит к увеличению транскрипции IFN γ -зависимых генов [31]. Кроме JAK-STAT1-сигнального пути, IFN γ стимулирует экспрессию генов через STAT1-независимый путь и активирует различные сигнальные каскады с участием адаптерного белка MyD88 [35], киназ p38 MAPK, PI3K и PKC [31]. Основными таргетными генами IFN γ являются гены, кодирующие молекулы гистосовместимости I и II класса, провоспалительные цитокины TNF- α и ИЛ-6, противомикробные белки, такие как NO-синтаза [31]. Активация PI3K IFN γ играет важную роль в индукции IFN γ -зависимых генов: так, ингибирование фермента блокирует IFN γ -зависимое фосфорилирование

STAT1 и снижает STAT1-опосредованную транскрипцию [29].

Исходя из полученных данных, TC-13 оказывает различные эффекты на параметры классической активации макрофагов. В отсутствие дополнительных стимулов, а также в низких концентрациях на фоне прототипических активаторов M1-поляризации (LPS + IFN γ) TC-13 угнетает экспрессию костимулирующих молекул, очевидно, за счет активации сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и снижения продукции АКМ, являющихся одним из индукторов CD86. Благодаря наличию лабильной связи S–S в *пара*-пропильном заместителе данный фенол нестабилен в слабощелочных растворах и образует симметричные дисульфиды за счет взаимодействия тиосульфата с образующимися при гидролизе тиолятами, что позволяет ему взаимодействовать с сульфгидрильными группами остатков цистеина белка Keap1 и тем самым увеличивать транскрипционную активность Nrf2. В то же время в концентрации 100 мкМ соединение действует синергично со стимуляторами классической активации и бактериальными агентами (БЦЖ), увеличивая экспрессию CD86. Такой эффект может быть опосредован Keap1-независимой индукцией Nrf2 через PI3K-путь, дополнительная активация которого усиливает IFN γ -зависимое фосфорилирование STAT1 и увеличивает экспрессию костимулирующих молекул.

Основным источником оксида азота в макрофагальных клетках является индуцибельная NO-синтаза (iNOS), однако макрофаги экспрессируют и конститутивную эндотелиальную NO-синтазу (eNOS) [11]. Более того, как показано в экспериментах на нокаутных по eNOS мышцах, при ее отсутствии в LPS-стимулированных макрофагах почти в 2 раза снижается экспрессия iNOS и NF- κ B, генерация NO \cdot [11]. Nrf2 может влиять на активность eNOS несколькими путями: увеличивая экспрессию фермента посредством повышения экспрессии PPAR γ [20], способствуя повышению антиоксидантной защиты и тем самым снимая разобщающее действие АКМ на eNOS [19], увеличивая экспрессию диметиларгининдиметиламиногидролаз, которые метаболизируют асимметричный диметиларгинин, эндогенный ингибитор eNOS [20]. Кроме того, фермент может быть активирован за счет фосфорилирования через PI3K/Akt-зависимый сигнальный путь, в том числе при стимуляции LPS [38].

TC-13 оказывает дозозависимый эффект на продукцию NO \cdot макрофагами вне зависимости от дополнительной стимуляции IFN γ и LPS, очевидно, реализуя все указанные пути стимуляции eNOS и последующей продукции оксида азота ин-

дуцибельной NO-синтазой. Аналогичный эффект соединения обнаружен нами ранее при стимуляции перитонеальных макрофагов LPS, при этом в указанном диапазоне концентраций ТС-13 ингибировал активность аргиназы [7]. Микобактерия БЦЖ стимулировала продукцию NO[•] перитонеальными макрофагами, в присутствии 20 мкМ ТС-13 эффект снижался, но не был изменен при наличии в среде инкубирования 100 мкМ соединения, в обоих случаях генерация оксида азота была сопоставима с изолированным эффектом ТС-13 (см. табл. 2). Такие разнонаправленные эффекты можно связать с различными механизмами активации продукции NO[•] микобактерией БЦЖ и ТС-13: БЦЖ стимулирует экспрессию iNOS и продукцию NO[•] за счет активации NF-κB, а индукция Nrf2 снижает активность NF-κB и нивелирует его эффекты.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о неоднозначном эффекте индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE синтетического фенола ТС-13 на активацию макрофагов по классическому пути: при его изолированном применении одни маркеры M1-поляризации увеличиваются (продукция NO[•]), другие снижаются (экспрессия CD86), в то время как при совместном применении с прототипическими индукторами классической либо наблюдался синергичный эффект, либо проявлялся феномен концентрационной инверсии. Любопытно, что ранее нами продемонстрирован аналогичный разнонаправленный эффект ТС-13: в низких концентрациях соединение увеличивало жизнеспособность макрофагоподобных клеток в обычных условиях и при окислительном стрессе, а в высоких концентрациях – снижало [2]. Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что деление макрофагов на классически и альтернативно активированные довольно схематично и применимо при анализе их функционирования в конкретные, как правило полярные, моменты течения воспаления (острая фаза – репарация, «fight or fix»), в более общем случае уместнее говорить о макрофагах, образно называемых клетками-хамелеонами [17, 18], как о континууме фенотипов [26]. Например, в моделях *in vivo* макрофаги могут экспрессировать и M1-, и M2-маркеры [16]; выделяют такие крупные субклассы макрофагов с гибридным либо специфическим фенотипом, как опухольассоциированные (TAMs), индуцированные микобактериальной инфекцией супрессорные (MIS), атеросклеротические (Mox, Mhem, M4), при этом показано, что на поздних стадиях развития атеросклеротической бляшки Nrf2 способствует переключению макрофагов с фенотипа M2 на M1 [27]. В целом можно заключить, что от

активности системы Keap1/Nrf2/ARE зависит фенотипическая пластичность макрофагов, изменяющаяся в зависимости от окружающих условий, а также природы, интенсивности, продолжительности и момента воздействия индуктора сигнальной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-00551а) с использованием оборудования ЦКП НИИ экспериментальной и клинической медицины «Современные оптические системы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Шкуруний В.А. Механизмы активации макрофагов // Успехи соврем. биологии. 2007. 127. (3). 243–256.
2. Лемза А.Е., Ткачев В.О., Зенков Н.К. и др. Структурно-функциональные особенности влияния новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на жизнеспособность клеток // Сиб. науч. мед. журн. 2015. (2). 16–22.
3. Малышев И.Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. 2015. (2). 99–111.
4. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ткачев В.О. и др. Защитное действие ARE-индуцирующего фенольного антиоксиданта ТС-13 при хроническом воспалении // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2013. 155. (3). 305–309.
5. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Чечушков А.В. и др. Участие активированных кислородных метаболитов и редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в развитии гранулематозного воспаления // Сиб. науч. мед. журн. 2015. (2). 32–36.
6. Просенко А.Е., Клепикова С.Ю., Кандалинцева Н.В. и др. Синтез и исследование антиоксидантных свойств новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Бюл. СО РАМН. 2001. (1). 114–126.
7. Ткачев В.О., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. и др. Синтетический водорастворимый фенольный антиоксидант регулирует метаболизм L-аргинина в макрофагах: возможная роль Nrf2/ARE // Биохимия. 2010. 75. (5). 637–643.
8. Al-Huseini L.M., Aw Yeang H.X., Sethu S. et al. Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) modulates dendritic cell immune function through regulation of p38MAPK-CREB/ATF1 signalling // J. Biol. Chem. 2013. 288. 22281–22288.
9. Balogun E., Hoque M., Gong P. et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation

- of Nrf2 and the antioxidant-responsive element // *Biochem. J.* 2003. 371. 887–895.
10. Brune B., Dehne N., Grossmann N. et al. Redox control of inflammation in macrophages // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. 19. 595–637.
 11. Connelly L., Jacobs A.T., Palacios-Callender M. et al. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression // *J. Biol. Chem.* 2003. 278. 26480–26487.
 12. Crook-McMahon H.M., Olahova M., Button E.L. et al. Genome-wide screening identifies new genes required for stress-induced phase 2 detoxification gene expression in animals // *BMC Biol.* 2014. 12. 64.
 13. Gharib S.A., Johnston L.K., Huizar I. et al. MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis // *J. Leukoc. Biol.* 2014. 95. 9-18.
 14. Harvey C.J., Thimmulappa R.K., Sethi S. et al. Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model // *Sci. Transl. Med.* 2011. 3. 78ra32.
 15. Holland R., Fishbein J.C. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1 // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. 13. 1749–1761.
 16. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P. et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // *J. Neurosci.* 2009. 29. 13435–13444.
 17. Kolattukudy P., Sirakova T., Kapoor N. Macrophage: How the chameleon responds to the environment? // *Macrophage.* 2015. 2. e927.
 18. Lee E., Kilfeather S.A. Airway macrophages and dendritic cells // *Cellular Mechanisms in Airways Inflammation* / Eds. C.P. Page, K.H. Banner, D. Spina. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser Basel, 2000. P. 199–222.
 19. Li H., Horke S., Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis // *Atherosclerosis.* 2014. 237. 208–219.
 20. Luo Z., Aslam S., Welch W.J., Wilcox C.S. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 coordinates dimethylarginine dimethylaminohydrolase/PPAR-g/endothelial nitric oxide synthase pathways that enhance nitric oxide generation in human glomerular endothelial cells // *Hypertension.* 2015. 65. 896–902.
 21. MacMicking J.D. Recognizing macrophage activation and host defense // *Cell Host Microbe.* 2009. 5. 405–407.
 22. Malhotra D., Portales-Casamar E., Singh A. et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis // *Nucleic Acids Res.* 2010. 38. 5718–5734.
 23. Martin D., Rojo A.I., Salinas M. et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol // *J. Biol. Chem.* 2004. 279. 8919–8929.
 24. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // *Front. Biosci.* 2008. 13. 453–461.
 25. Menshchikova E., Tkachev V., Lemza A. et al. Water-soluble phenol TS-13 combats acute but not chronic inflammation // *Inflamm. Res.* 2014. 63. 729–740.
 26. Mills C. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease // *Crit. Rev. Immunol.* 2012. 32. 463–488.
 27. Mimura J., Itoh K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. 88. 221–232.
 28. Naito Y., Takagi T., Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages // *Arch. Biochem. Biophys.* 2014. 564. 83–88.
 29. Nguyen H., Ramana C.V., Bayes J., Stark G.R. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression // *J. Biol. Chem.* 2001. 276. 33361–33368.
 30. Palanisamy G.S., Kirk N.M., Ackart D.F. et al. Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in Guinea pigs with tuberculosis // *PLoS One.* 2011. 6. e26254.
 31. Plataniias L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. 5. 375–386.
 32. Rangasamy T., Williams M.A., Bauer S. et al. Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 inhibits the maturation of murine dendritic cells by ragweed extract // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2010. 43. 276–285.
 33. Rojo A.I., Medina-Campos O.N., Rada P. et al. Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3 // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. 52. 473–487.
 34. Saito R., Suzuki T., Hiramoto K. et al. Characterizations of three major cysteine sensors of Keap1 in stress response // *Mol. Cell. Biol.* 2015. [Epub ahead of print]. doi 10.1128/MCB.00868–00815.
 35. Sun D., Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA // *Nat. Immunol.* 2006. 7. 375–381.
 36. Thornton T.M., Pedraza-Alva G., Deng B. et al. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3b inactivation // *Science.* 2008. 320. 667–670.
 37. Van Weeren P.C., de Bruyn K.M., de Vries-Smits A.M. et al. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB // *J. Biol. Chem.* 1998. 273. 13150–13156.

38. Yao H., Han X. The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway // *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2014. 14. 433–442.

39. Zhang M., An C., Gao Y. et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection // *Prog. Neurobiol.* 2013. 100. 30–47.

40. Zhang Y., Choksi S., Chen K. et al. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages // *Cell Res.* 2013. 23. 898–914.

INDUCTION OF REDOX-SENSITIVE Keap1/Nrf2/ARE SYSTEM ALTERS CLASSICAL ACTIVATION OF MACROPHAGES

**Peter Mikhaylovich KOZHIN¹, Nikolay Konstantinovich ZENKOV¹,
Anna Evgen'evna LEMZA¹, Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV¹,
Natal'ya Sergeevna ZAITSEVA¹, Natal'ya Valer'evna KANDALINTSEVA²,
Elena Bronislavovna MENSCHHIKOVA¹**

¹ *Research Institute for Experimental and Clinical and Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *Novosibirsk State Pedagogical University
630126, Novosibirsk, Viluyskaya str., 28*

The aim of the study was to investigate the effect of phenolic antioxidant 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate sodium (TS-13), which induces redox-sensitive Keap1/Nrf2/ARE system, on classical polarization of macrophages. The influence of TS-13 on expression of costimulatory molecule CD86 and nitric oxide (NO^{*}) production by peritoneal macrophages of BALB/c mice has been studied. TS-13 has been found to inhibit surface antigen CD86 expression in the absence of additional priming with IFN γ and LPS, as well as in low concentrations in the presence of IFN γ and LPS. High concentrations (100 μ M) of TC-13 have a synergistic effect with inducers of classical activation and bacterial agents (BCG) and increase expression of costimulatory molecules. Further, TS-13 dose-dependently stimulates the production of NO^{*} by macrophages, regardless of the additional stimulation of IFN γ + LPS or BCG. The data suggest that the induction of Keap1/Nrf2/ARE system, which activates the defense mechanisms against aggressive influences (including changes in redox status), can both inhibit and enhance macrophage activation by the classical pathway.

Key words: Keap1/Nrf2/ARE signal system, TS-13, macrophage polarization, CD86, nitric oxide.

Kozhin P.M. – researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes,
e-mail: kozhinpm@gmail.com

Zenkov N.K. – doctor of biological sciences, leading researcher, laboratory of molecular mechanisms
of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru

Lemza A.E. – candidate of biological sciences, researcher, laboratory of molecular mechanisms
of free radical processes, e-mail: lemza.ae@yandex.ru

Chechushkov A.V. – researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes,
e-mail: achechushkov@gmail.com

Zaitseva N.S. – candidate of biological sciences, researcher, laboratory of molecular mechanisms
of free radical processes, e-mail: nszaitseva@gmail.com

Kandalintseva N.V. – candidate of chemical sciences, director of Institute of Natural, Social
and Economic Sciences, e-mail: aquaphenol@mail.ru

Menschchikova E.B. – doctor of medical sciences, head of the laboratory of molecular mechanisms
of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ НОВОЙ БИМЕДИЦИНСКОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ СВИНЫХ ПОЧЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

**Александр Юрьевич ЖАРИКОВ, Вячеслав Витальевич ЛАМПАТОВ,
Валерий Михайлович БРЮХАНОВ, Ольга Сергеевна ТАЛАЛАЕВА,
Юрий Григорьевич МОТИН, Ганна Викторовна ПАВЛЯШИК,
Дмитрий Владимирович ЕЛИСЕЕВ**

*ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России
656038, г. Барнаул, просп. Ленина, 40*

Цель данной работы – апробировать в условиях экспериментальной мочекаменной болезни (МКБ) антилитогенную активность новой биомедицинской субстанции из свиных почек. Эксперименты проведены на двух группах аутобредных самцов крыс сток Вистар по 15 особей в каждой. В первой (контрольной) группе животные на протяжении 6 недель получали в виде питья 1%-й раствор этиленгликоля (ЭГ). Крысам второй группы (группа лечения) начиная с 4-й недели на фоне продолжающегося потребления ЭГ ежедневно применяли новую биомедицинскую субстанцию из сырья свиных почек в дозе 1,0 на крысу. Производство субстанции осуществлялось на ЗАО «Алтайвитамины» (г. Бийск, Алтайский край, Россия) методом лиофильного высушивания. В обеих группах каждые 3–4 дня в моче, собранной за сутки, определяли концентрацию ионов оксалата, фосфата и кальция, активность маркерных ферментов: лактатдегидрогеназы, γ -глутамилтрансферазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, а также показатели активности свободнорадикального окисления (СРО) в почках. Гистохимическим методом Косса на почечных срезах крыс определяли наличие кальций-позитивных отложений. У крыс контрольной группы фиксировалось развитие выраженной экспериментальной МКБ, признаками которой являлись пересыщение мочи оксалат-ионами, существенное увеличение активности маркерных ферментов, активация процессов СРО в почках, а также отложение в почках кальциевых депозитов. В группе лечения наблюдалось существенное облегчение протекания экспериментальной патологии, о чем свидетельствовало ослабление пересыщения мочи оксалат-ионами, выраженное снижение ферментурии, а также угнетение процессов СРО и значительное уменьшение количества кальциевых отложений и их размеров. В результате проведенных экспериментов получены свидетельства высокой антилитогенной активности новой биомедицинской субстанции из свиных почек.

Ключевые слова: антилитогенное действие, биомедицинская субстанция.

Ранее нами установлено, что длительное применение сырья из свиных почек приводит к существенному облегчению протекания экспериментальной мочекаменной болезни (МКБ) у крыс [1]. Характерными диагностическими признаками этого стали ослабление пересыщения мочи оксалат-ионом, выраженное снижение активности маркерных ферментов повреждения почечного эпителия, угнетение процессов свободнорадикального окисления (СРО) в почечной

ткани, а также значительное уменьшение количества и размеров кальциевых отложений в почках [1]. Эти результаты позволили предположить, что сырье из свиных почек может являться весьма перспективным источником для разработки нового эффективного антилитогенного средства.

Учитывая вышесказанное, мы поставили цель апробировать в условиях экспериментальной МКБ антилитогенную активность новой биомедицинской субстанции из свиных почек.

Жариков А.Ю. – д.б.н., проф. кафедры фармакологии, e-mail: zharikov_a_y@mail.ru

Лампатов В.В. – д.б.н., проф. кафедры фармакологии, e-mail: lampatov@asmu.ru

Брюханов В.М. – д.м.н., зав. кафедрой фармакологии, e-mail: bvm@agmu.ru

Талалаева О.С. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, e-mail: talalaeva_olga@mail.ru

Мотин Ю.Г. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии, e-mail: ymotin@mail.ru

Павляшик Г.В. – e-mail: ganna1704@mail.ru

Елисеев Д.В. – e-mail: dezoxadenozin@gmail.com

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 30 аутбредных самцах крыс сток Вистар массой 220–280 г, которые находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях стандартной лабораторной диеты. Моделирование МКБ осуществлялось по общепринятой этиленгликолевой модели, согласно которой литогенез провоцируется постоянным употреблением подопытными животными в виде питья 1%-го раствора этиленгликоля (ЭГ) [2].

Подопытные животные были разделены поровну на 2 группы. В первой (контрольной) группе крысы на протяжении 6 недель получали в виде питья 1%-й раствор ЭГ. Крысам второй группы (группа лечения) начиная с 4-й недели на фоне продолжающегося потребления ЭГ ежедневно в течение последующих 3-х недель в пищевой рацион включали биомедицинскую субстанцию из свиных почек в дозе 1,0 на крысу.

Технологическое производство биомедицинской субстанции из свиных почек осуществлялось на ЗАО «Алтайвитамины» (г. Бийск, Россия) в соответствии с двусторонним договором. Технология производства базировалась на методе лиофильного высушивания и состояла из следующих этапов: 1) подготовка биологического материала – размораживание сырых свиных почек при комнатной температуре, удаление поверхностного жира, гомогенизация на лабораторном гомогенизаторе при 10 тыс. оборотов в минуту в течение 5 минут, взвешивание и распределение гомогената на тарированные поддоны ровным слоем толщиной не более 0,5 см; 2) заморозка (стеклование) продукта при температуре $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 ч; 3) первичная сушка – высушивание продукта в вакуумной камере при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 10 Па на протяжении 48 ч; 4) вторичная сушка – досушивание продукта при температуре $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 ч. В результате описанного процесса удалось добиться удаления 80 % влаги из биологического материала при сохранении его структурной и функциональной целостности.

Каждые 3–4 дня в обеих экспериментальных группах собирали суточный объем мочи, в которой определяли концентрацию ионов оксалата, фосфата и кальция, а также экскрецию креатинина. Кроме того, каждые 7 дней измеряли активность в моче маркерных ферментов повреждения почечного эпителия: лактатдегидрогеназы – ЛДГ (характеризует степень цитолиза клеток), γ -глутамилтрансферазы – ГГТ (свидетельствует о степени повреждения клеточных мембран), N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы –

НАГ (демонстрирует функциональные нарушения нефроцитов).

Содержание оксалат-иона в моче определяли при помощи ВЭЖХ по разработанной нами методике [4]. В качестве элюентов использовали 80%-й раствор ацетонитрила при градиенте от 0 до 100 % и 0,1%-й раствор серной кислоты. Скорость подачи элюентов – 100 мкл/мин, объем элюирования – 1000 мкл, температура хроматографической колонки – $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Детектирование проводилось при длине волны $\lambda = 210\text{ нм}$. Для расчетов применялся калибровочный график, который строили, используя стандартный раствор оксалат-иона в концентрации 1 мг/мл (Fluka, Германия). Содержание фосфат-ионов определяли методом фотоэлектроколориметрии (ФЭК) при длине волны $\lambda = 440\text{ нм}$. Методика основана на реакции образования фосфорно-молибденованадиевого комплекса, который имеет характерную желтую окраску. Ионы кальция в моче также определяли методом ФЭК по реакции с о-крезолфталеин-комплексом при длине волны $\lambda = 590\text{ нм}$.

Активность ЛДГ определяли методом спектрофотометрии при длине волны $\lambda = 340\text{ нм}$. В основе метода лежит реакция восстановления пирувата до молочной кислоты. Эта реакция катализируется ЛДГ, а ее скорость пропорциональна активности фермента. Каталитическая активность ГГТ, для измерения которой использовался метод ФЭК, рассчитывалась пропорционально количеству п-нитроанилина, образующегося в результате реакции взаимодействия L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида и глицилглицина и детектируемого при длине волны $\lambda = 400\text{ нм}$. Активность НАГ определяли по модифицированной методике D. Maruch [7], согласно которой активность НАГ пропорциональна количеству п-нитрофенола, образующегося в результате реакции гидролиза ферментом п-нитро-N-ацетил- β -глюкозамида. Количество п-нитрофенола измеряли спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 400\text{ нм}$. Активность всех определяемых ферментов рассчитывали относительно концентрации креатинина в моче, выражавшейся в мг/л, и обозначали в условных единицах (ЕД/мг креатинина).

По истечении 6-й недели эксперимента с целью изучения активности процессов СРО, важного индикатора литогенеза [3, 5], а также для проведения морфологических исследований почек подопытных животных по 5 крыс из каждой группы подвергали эвтаназии с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.). Суммар-

ный показатель концентрации всех прооксидантов и свободнорадикальных метаболитов, общую прооксидантную активность (ОПА) определяли в гомогенате коркового вещества почек по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. Дополнительно определяли концентрацию в ткани малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитуратреактивных продуктов окисления жирных кислот (ТБРП). Для оценки антиоксидантного статуса клеток определяли общую антиоксидантную активность (ОАА) и активности антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). ОАА оценивали по степени ингибирования Fe^{2+} /аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гомогенатом ткани (гемолизатом эритроцитов). Активность каталазы определяли по подавлению ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода. Активность СОД оценивали по содержанию в пробе нитроформазана, окрашенного продукта восстановления нитротетразолия супероксидными анион-радикалами. Маркером активности ГПО служило содержание восстановленного глутатиона, определяемого по цветной реакции с реактивом Элмана.

Морфологическое исследование почек крыс выполняли с использованием светооптической микроскопии. В качестве фиксирующей жидкости применяли 10%-й раствор формалина. Для оценки изменений коркового и мозгового вещества почки срезы ткани толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На срезах толщиной 10–15 мкм гистохимическим методом Косса определяли наличие соединений кальция как отложения черного цвета. Ядра при этом окрашиваются в красный, а остальные тканевые структуры – в розовый цвет. Увеличение $\times 100$, $\times 400$.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием критерия Манна–Уитни [6]. Все расчеты велись по общепринятым формулам. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – ошибка среднего, n – количество образцов мочи для анализа в указанный день наблюдения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате шестинедельного применения ЭГ у крыс контрольной группы фиксировались характерные биохимические и морфологические

признаки развития экспериментальной МКБ. Так, уже на 3-й день опыта в моче подопытных животных формировался стабильно высокий уровень оксалат-иона, сохранявшийся на протяжении всего эксперимента (табл. 1). Кроме того, у крыс контрольной группы наблюдался последовательный рост активности в моче маркерных ферментов. Как видно из табл. 3, к исходу 6-й недели моделирования патологии активность ЛДГ увеличилась в 2,9 раза, ГГТ – в 1,6 раза, НАГ – в 3,8 раза (для всех – $p < 0,001$ относительно исходного уровня). Параллельно наблюдалась отчетливая картина развития окислительного стресса (табл. 3). Так, концентрация ТБРП увеличилась в 8,3 раза ($p < 0,001$) и на 7,5 % снижалась активность ГПО ($p < 0,03$). Наиболее весомым подтверждением возникновения литогенных процессов в почках крыс контрольной группы явились результаты морфометрии, согласно которым количество кальциевых депозитов в области почечного сосочка составило $27,4 \pm 3,22$ в поле зрения, а их средний размер – $12,0 \pm 0,62$ мкм.

В группе лечения в первые 3 недели моделирования заболевания также наблюдались типичные биохимические признаки нефролитиаза (табл. 2). К таковым следует отнести пересыщение мочи оксалат-ионом и усиление ферментурии, вследствие чего активность в моче ЛДГ и НАГ к концу 3-й недели наблюдения превышала исходный уровень в 2,1 и 1,6 раза соответственно (для обоих – $p < 0,001$). Однако впоследствии проведенное лечение привело к существенному облегчению протекания экспериментальной МКБ (см. табл. 2). Так, наблюдалось снижение уровня мочевого концентрации оксалат-иона в 1,3–1,5 раза относительно показателя 21-го дня. Кроме того, ферментативная активность в моче подопытных животных, получавших лечение, существенно ослаблялась, в результате чего активность ЛДГ к концу эксперимента была даже в 2,1 раза меньше исходного уровня. Аналогичная динамика прослеживалась и в отношении активности НАГ (табл. 4).

Помимо этого, были выявлены существенные изменения выраженности окислительного стресса в почечной ткани подопытных крыс. Как следует из табл. 3, по завершении курса назначения биомедицинской субстанции из свиных почек концентрация ТБРП уменьшилась относительно контроля заболевания в 3,7 раза ($p < 0,001$), при том что активность всех трех антиоксидантных ферментов значительно возросла, как в сравнении с контролем заболевания, так и относительно уровня интактных животных. Наконец, согласно результатам морфометрии, количество кальцие-

Таблица 1

Показатели экскреторной функции почек у крыс контрольной группы в условиях экспериментальной МКБ

Дни	Содержание оксалата, мг/мл	Содержание фосфата, мг/мл	Содержание кальция, мкмоль/мл	Диурез, мл/сут	Содержание креатинина, ммоль/сут
	Исходный уровень				
	–	9,1 ± 0,38 (n = 15)	1,8 ± 0,10 (n = 15)	5,3 ± 0,36 (n = 15)	7,1 ± 0,38 (n = 15)
Моделирование нефролитиаза					
3	1,3 ± 0,29* (n = 12)	9,0 ± 0,47 (n = 12)	1,9 ± 0,19 (n = 8)	5,9 ± 0,65 (n = 12)	9,3 ± 0,66* (n = 8)
7	1,2 ± 0,14* (n = 15)	8,0 ± 0,44 (n = 15)	1,3 ± 0,09* (n = 15)	5,4 ± 0,48 (n = 15)	8,5 ± 0,61 (n = 15)
10	1,3 ± 0,10* (n = 9)	8,5 ± 0,40 (n = 9)	Не определялось	6,5 ± 0,64 (n = 9)	Не определялось
14	1,4 ± 0,13* (n = 15)	8,2 ± 0,33 (n = 15)	1,6 ± 0,22 (n = 15)	5,9 ± 0,43 (n = 15)	6,3 ± 0,44 (n = 15)
17	1,1 ± 0,10* (n = 15)	8,1 ± 0,21 (n = 15)	1,9 ± 0,13 (n = 15)	7,7 ± 0,96* (n = 15)	10,9 ± 0,63* (n = 15)
21	1,3 ± 0,13* (n = 15)	7,4 ± 0,46* (n = 15)	1,9 ± 0,23 (n = 15)	6,7 ± 0,55* (n = 15)	7,2 ± 0,49 (n = 15)
24	1,6 ± 0,17* (n = 15)	5,9 ± 0,43* (n = 15)	1,4 ± 0,14 (n = 15)	7,6 ± 1,41 (n = 15)	9,2 ± 0,84 (n = 15)
28	1,6 ± 0,16* (n = 15)	6,2 ± 0,40* (n = 15)	1,5 ± 0,10 (n = 15)	7,7 ± 0,78* (n = 15)	8,6 ± 1,00 (n = 15)
31	1,3 ± 0,12* (n = 8)	7,9 ± 0,63 (n = 8)	1,5 ± 0,28 (n = 8)	9,4 ± 1,73* (n = 8)	Не определялось
35	1,3 ± 0,12* (n = 15)	6,1 ± 0,50* (n = 15)	1,6 ± 0,06 (n = 15)	8,2 ± 1,01* (n = 15)	8,4 ± 0,74 (n = 15)
38	1,7 ± 0,21* (n = 9)	8,2 ± 0,17 (n = 8)	Не определялось	5,6 ± 0,64 (n = 9)	9,8 ± 0,68* (n = 9)
42	1,3 ± 0,14* (n = 15)	6,2 ± 0,45* (n = 15)	1,6 ± 0,17 (n = 15)	9,0 ± 1,19* (n = 15)	8,3 ± 1,03 (n = 14)

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * – отличие от величины соответствующего показателя интактных животных статистически значимо при $p < 0,05$.

вых депозитов, формирующихся в области почечного сосочка пролеченных крыс, уменьшилось относительно контроля заболевания в 12,5 раза (с $27,4 \pm 3,22$ до $2,2 \pm 2,00$ в поле зрения), а их средний размер – в 3,2 раза (с $12,0 \pm 0,62$ мкм до $3,7 \pm 3,55$ мкм; $p < 0,001$).

Обсуждая полученные результаты, отметим, что проведенные эксперименты наглядно продемонстрировали высокую антилитогенную активность новой биомедицинской субстанции из свиных почек. При этом обращает на себя внимание политаргетный характер терапевтического эффекта новой субстанции при экспериментальной мочекаменной болезни. Мишенями для коррекции стали такие звенья патогенеза оксалатного

нефролитиаза, как окислительный стресс в почечной ткани, повреждение уротелия, пересыщение мочи литогенными ионами и кристаллизация почечных конкрементов. Все это закономерно воплотилось в существенное снижение количества и размеров кальциевых отложений в почках подопытных крыс.

Не исключено, что политаргетное действие новой субстанции определяется комплексом ее биомедицинских свойств, зависящих от органического состава тканей свиных почек. Изучение этих свойств и поиск действующего начала в новой субстанции станет предметом дальнейших наших исследований. Пока же с определенной долей уверенности можно полагать, что техно-

Таблица 2

Влияние новой биомедицинской субстанции из свиных почек на показатели экскреторной функции почек у крыс группы лечения в условиях экспериментальной МКБ

Дни	Содержание оксалата, мг/мл	Фосфата, мг/мл	Содержание кальция, мкмоль/мл	Диурез, мл/сут	Содержание креатинина, ммоль/сут
	Исходный уровень				
	–	9,0 ± 0,20 (n = 15)	2,2 ± 0,10 (n = 15)	4,0 ± 0,49 (n = 15)	5,8 ± 0,52 (n = 15)
Моделирование нефролитиаза					
3	1,5 ± 0,13 (n = 15)	9,4 ± 0,91 (n = 13)	2,1 ± 0,18 (n = 15)	3,5 ± 0,56 (n = 15)	5,9 ± 0,54 (n = 15)
7	1,8 ± 0,19 (n = 11)	8,6 ± 0,20 (n = 12)	1,4 ± 0,13* (n = 15)	4,1 ± 0,16 (n = 15)	6,5 ± 0,69 (n = 14)
10	1,6 ± 0,11 (n = 15)	7,6 ± 0,15 (n = 15)	1,8 ± 0,08* (n = 15)	4,3 ± 0,72 (n = 15)	4,9 ± 0,52 (n = 14)
14	1,6 ± 0,12 (n = 13)	7,7 ± 0,31 (n = 10)	1,8 ± 0,17* (n = 12)	4,2 ± 0,73 (n = 14)	6,6 ± 0,63 (n = 14)
17	1,4 ± 0,09 (n = 15)	8,3 ± 0,36 (n = 15)	1,5 ± 0,06* (n = 15)	5,3 ± 0,84 (n = 15)	7,2 ± 0,77 (n = 15)
21	1,5 ± 0,11 (n = 12)	11,3 ± 0,28* (n = 14)	2,0 ± 0,21 (n = 13)	4,1 ± 0,67 (n = 15)	7,1 ± 0,52 (n = 15)
Лечение					
24	1,2 ± 0,10 (n = 14)	11,5 ± 0,46* (n = 14)	1,1 ± 0,05* (n = 14)	4,5 ± 0,64 (n = 14)	6,4 ± 0,78 (n = 14)
28	1,0 ± 0,07 (n = 14)	10,8 ± 0,40* (n = 14)	2,4 ± 0,16 (n = 14)	5,9 ± 0,93 (n = 14)	8,3 ± 0,95* (n = 14)
31	1,1 ± 0,09 (n = 15)	11,2 ± 0,38* (n = 15)	1,6 ± 0,06* (n = 15)	4,7 ± 0,69 (n = 15)	6,4 ± 0,92 (n = 15)
35	1,1 ± 0,05 (n = 14)	11,4 ± 0,32* (n = 15)	1,5 ± 0,09* (n = 15)	4,8 ± 0,39 (n = 15)	7,1 ± 0,63 (n = 15)
38	0,9 ± 0,07 (n = 12)	11,5 ± 0,34* (n = 15)	1,2 ± 0,06* (n = 15)	5,4 ± 0,73 (n = 15)	7,8 ± 0,90 (n = 15)
42	1,0 ± 0,08 (n = 15)	11,2 ± 0,41* (n = 15)	1,3 ± 0,06* (n = 15)	5,2 ± 0,83 (n = 15)	7,3 ± 0,84 (n = 15)

Таблица 3

Показатели активности свободнорадикального окисления в почках крыс с экспериментальной МКБ в контроле и в условиях применения новой биомедицинской субстанции из свиных почек

Показатель	Исходный уровень	Контрольная группа	Группа лечения
Содержание ТБРП, мкМ	2,9 ± 0,18	24,1 ± 0,62*	6,5 ± 0,64*.#
ОПА, %	75,5 ± 2,71	78,2 ± 2,71	73,0 ± 2,24
Активность каталазы, %	11,9 ± 0,79	13,6 ± 1,50	28,5 ± 2,66*.#
Активность СОД, %	14,9 ± 1,61	11,6 ± 1,26	23,4 ± 1,03*.#
Активность ГПО, %	37,4 ± 1,88	29,9 ± 2,45*	39,7 ± 1,80#

Примечание. # – отличие от величины соответствующего показателя животных контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 4

Ферментативная активность в моче крыс с экспериментальной МКБ в контроле и в условиях применения новой биомедицинской субстанции из свиных почек, ЕД/мг креатинина в сутки

Дни	Контрольная группа			Группа лечения		
	ЛДГ	ГГТ	НАГ ($\times 10^{-3}$)	ЛДГ	ГГТ	НАГ ($\times 10^{-3}$)
	Исходный уровень					
	0,18 \pm 0,015 (n = 15)	0,26 \pm 0,015 (n = 15)	8,4 \pm 0,32 (n = 15)	0,21 \pm 0,015 (n = 11)	0,33 \pm 0,015 (n = 10)	9,8 \pm 0,46 (n = 15)
Моделирование нефролитиаза						
7	0,32 \pm 0,024* (n = 15)	0,30 \pm 0,015 (n = 15)	14,4 \pm 2,48* (n = 15)	0,35 \pm 0,025 (n = 14)	0,36 \pm 0,015 (n = 14)	10,5 \pm 0,48 (n = 14)
14	0,50 \pm 0,033* (n = 15)	0,32 \pm 0,011* (n = 15)	19,4 \pm 1,40* (n = 15)	0,44 \pm 0,034 (n = 14)	0,42 \pm 0,014 (n = 14)	15,3 \pm 0,97 (n = 14)
21	0,52 \pm 0,032* (n = 15)	0,37 \pm 0,015* (n = 15)	20,1 \pm 2,11* (n = 15)	0,45 \pm 0,013 (n = 13)	0,36 \pm 0,011 (n = 8)	Не определено
Лечение						
28	0,44 \pm 0,018* (n = 15)	0,30 \pm 0,010 (n = 15)	17,2 \pm 0,90* (n = 15)	0,36 \pm 0,020 (n = 14)	0,38 \pm 0,016 (n = 14)	7,3 \pm 0,33 (n = 14)
35	0,45 \pm 0,025* (n = 15)	0,42 \pm 0,049* (n = 15)	15,4 \pm 1,26* (n = 15)	0,09 \pm 0,014 (n = 15)	0,36 \pm 0,018 (n = 13)	6,5 \pm 0,52 (n = 15)
42	0,53 \pm 0,018* (n = 15)	Не определено	31,9 \pm 2,86* (n = 15)	0,10 \pm 0,008 (n = 15)	0,37 \pm 0,013 (n = 14)	8,5 \pm 0,37 (n = 15)

логическая обработка тканей свиных почек, по крайней мере щадящими методами, не снижает их антилитогенной активности, что создает хорошие предпосылки для разработки оптимальной технологической схемы производства нового антилитогенного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что трехнедельное применение новой биомедицинской субстанции из свиных почек при экспериментальной мочекаменной болезни сопровождается выраженным антилитогенным действием, не уступающим по силе сырью из свиных почек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брюханов В.М., Жариков А.Ю., Зверев Я.Ф. и др. Опыт применения сырья из свиных почек для фармакологической коррекции экспериментального нефролитиаза // Бюл. СО РАМН. 2011. 31. (3). 97–103.
2. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза // Нефрология. 2008. 12. (4). 33–36.
3. Жариков А.Ю., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе // Нефрология. 2009. 13. (4). 37–50.
4. Жариков А.Ю., Лампатов В.В., Зверев Я.Ф. и др. Новый способ определения оксалат-ионов в моче // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. (12). 3–5.
5. Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Талалаева О.С. и др. О роли процессов свободнорадикального окисления в развитии экспериментального нефролитиаза // Нефрология. 2008. 12. (1). 58–63.
6. Хафазиянова Р.Х., Бурыкин И.М., Алеева Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии. Казань: Медицина, 2006. 374 с.
7. Maruch D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine // Clin. Chim. Acta. 1976. 73. 453–446.

EXPERIMENTAL APROBATION OF NEW BIOMEDICINE SUBSTENCE FROM PORK KIDNEYS AT THE EXPERIMENTAL KIDNEY STONE DISEASE

**Alexander Yurjevich ZHARIKOV, Vyacheslav Vitaljevich LAMPATOV,
Valery Mikhajlovich BRYUKHANOV, Olga Sergeevna TALALAEVA,
Yury Grigorjevich MOTIN, Ganna Viktorovna PAVLYASHIK,
Dmitri Vladimirovich ELISEEV**

*Altay State Medical University of Minzdrav of Russia
656038, Barnaul, Lenin av., 40*

The aim of present investigation was approbation in experimental kidney stone disease conditions antilitogenic action of new biomedicine substance from pork kidney. Experiments were performed on 30 male divided into 2 groups. In control group 1 % solution of ethylenglycole (EG) was given as drink for the rats during 6 weeks. The rats of therapy group were given EG during 6 weeks and the substance from raw material of pork kidneys was administrated in dose 1 g/rat from the 4-th week. Generating of substance from raw material of pork kidneys was carried out by the joint-stock company «Altayvitaminy». Technology of generating is based on lyophilic dehumidification. The oxalate, phosphate and calcium concentrations, activity of urothelium injury marker enzymes: lactate dehydrogenase (LDH), γ -glutamyl transferase (GGT), N-acetyl- β -D-glucose aminidase (NAG), and oxygen's free radicals activity were determined every 3-4 days in both rats groups. The calcium deposits were evaluated in the rats kidney sections by Van Koss hystochemical method. Chronic use of EG in control group resulted in experimental kidney stone disease progression which was indicated by oxalate super saturation in urine, enhancing of marker enzymes activity, activation of oxidative stress in the kidney and in the blood, and forming calcium deposits near renal papilla. The treatment of experimental nephrolithiasis led to the great relief. It was indicated by the significant reduction of oxaluria, pronounced decrease of marker enzymes activity: LDH, GGT, NAG, and reduction of oxidative stress. Finally, it was confirmed by morphological studies, which detected very significant reduction of calcium deposits number and their sizes. The evidence of high antilitogenic activity of new biomedicine substance from pork kidney has been revealed as the result of the research.

Key words: antilitogenic action, biomedicine substance.

*Zharikov A. Yu. – doctor of biological sciences, professor of the chair for pharmacology,
e-mail: zharikov_a_y@mail.ru*

Lampatov V.V. – doctor of biological sciences, professor of the chair for pharmacology, e-mail: lampatov@asmu.ru

Bryukhanov V.M. – doctor of medical sciences, head of the chair for pharmacology, e-mail: bvm@agmu.ru

*Talalaeva O.S. – candidate of medical sciences, assistant of professor of the chair for pharmacology,
e-mail: talalaeva_olga@mail.ru*

*Motin Yu.G. – candidate of medical sciences, assistant of professor of the chair for pathological anatomy,
e-mail: ymotin@mail.ru*

Pavlyashik G.V. – e-mail: ganna1704@mail.ru

Eliseev D.V. – e-mail: dezoxyadenozin@gmail.ru

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА ЛЕПТИНА И ХЕМОКИНА CXCL8 В УСЛОВИЯХ УГРОЗЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ И ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ**Владимир Иванович ЩЕРБАКОВ¹, Иван Михайлович ПОЗДНЯКОВ^{2,3}, Анна Владимировна ШИРИНСКАЯ³, Михаил Валентинович ВОЛКОВ⁴**¹ ФГБНУ НИИ экспериментальной и клинической медицины
630117 г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2² ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52³ ГБУЗ НСО Новосибирский городской перинатальный центр
630089, г. Новосибирск, ул. Адриена Лежена, 32⁴ ГБУЗ НСО Родильный дом № 2
630008, г. Новосибирск, ул. Чехова, 76

С целью изучения активности воспалительного процесса на базе Новосибирского городского перинатального центра в 2015 г. обследовано 67 беременных женщин, у которых определяли содержание лептина и хемокина CXCL8 при угрозе преждевременных родов и при преэклампсии. Установлено, что уровень лептина имел тенденцию к повышению, а содержание CXCL8 было достоверно повышено при угрозе преждевременных родов, при этом при преэклампсии величины обоих показателей статистически значимо превышали значения в контроле. Наблюдавшиеся случаи снижения концентрации лептина при угрозе преждевременных родов свидетельствуют о повышении сократительной активности матки. Повышенный уровень CXCL8 активирует нейтрофилы, что способствует индукции преждевременных родов. Оба этих показателя можно использовать в комплексе с другими методами для оценки воспалительного процесса при угрозе преждевременных родов и преэклампсии.

Ключевые слова: беременность, преждевременные роды, лептин, CXCL8, цитокины, хемокины, преэклампсия.

Преждевременные роды, осложняющие примерно 10 % от общего числа родов, являются во многом приоритетным направлением современного акушерства [2]. Несмотря на проводимое лечение, их уровень продолжает нарастать во всем мире [8], тем самым увеличивая количество недоношенных детей и заболеваемость в последующей жизни [5]. Полиэтиологичность, а соответственно, различия в патогенезе создают сложности как в создании единой классификации, так и в разработке адекватных методов диагностики, лечения и профилактики этой патологии [1].

Одной из важнейших причин индукции преждевременных родов служит воспаление [3] – как инфекционное, так и стерильное. Центральным звеном этой индукции являются цитокины, в том

числе хемокины, привлекающие в очаг воспаления иммунные клетки и в их составе нейтрофилы. Важную роль в индукции и поддержании воспаления на уровне плаценты, плодных оболочек, миометрия играют вещества, способствующие обеспечению клеток и тканей энергией, обладающие иммуностимулирующей активностью, такие как лептин. Открытие способности лептина угнетать сокращение матки *in vitro* [7], а также некоторых механизмов, за счет которых осуществляется это действие (стимуляция синтеза коллагена, ингибирование матриксных металлопротеиназ 2, 9 [10]), позволяют предполагать, что данный эффект может проследиваться и *in vivo* при угрозе преждевременных родов. Вклад преэклампсии в общее число преждевременных родов составляет

Щербаков В.И. – д.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии репродукции,
e-mail: Shcherbakov_VI@mail.ru

Поздняков И.М. – д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии, главный врач

Ширинская А.В. – врач-акушер-гинеколог, e-mail: anncharm2004@mail.ru

Волков М.В. – врач-акушер-гинеколог, e-mail: michaelis67@mail.ru

около 15 % [1–4]. Поэтому анализ условий, способствующих развитию преждевременных родов, позволит вычлениить их особенности для более правильной диагностики вектора развития беременности.

Цель работы – комплексное исследование содержания хемокина CXCL8 и лептина в сыворотке крови беременных женщин с угрозой преждевременных родов и преэклампсии для оценки активности воспалительного процесса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На базе Новосибирского городского перинатального центра в 2015 г. обследовано 67 беременных в возрасте от 24 лет до 37 лет третьего триместра. Выделено 3 группы, в которые вошли 23 женщины с угрозой преждевременных родов, 28 пациенток с преэклампсией и 16 женщин с нормально протекающей беременностью. Обследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», все лица дали информированное согласие на обследование. Содержание лептина и хемокина CXCL8 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью наборов «Leptin ELISA Kit Diagnostics Biochem Canada Ins», ООО «Вектор Бест» (Новосибирск) по инструкции производителя.

Параллельно проводился общий анализ крови с вычислением лейкоцитарной формулы, определялись биохимические показатели (содержание общего белка сыворотки крови, общего билирубина, мочевины, глюкозы, активность АсАТ и АлАТ), выполнялось ультразвуковое исследование. Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее

арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень лептина в группе с угрозой преждевременных родов имел тенденцию к повышению (рисунок, а), индивидуальные показатели отличались гетерогенностью. Функциональная значимость как повышенного, так и пониженного уровня лептина при угрозе преждевременных родов пока не ясна. При преэклампсии уровень лептина был достоверно увеличен (см. рисунок, а). В случае с угрозой преждевременных родов можно высказать предположение, что при концентрации лептина ниже контрольных цифр сократительная активность матки будет выше, чем у женщин с повышенным содержанием лептина. Так, в работе [7] *in vitro* показана способность лептина ингибировать сокращение матки. С другой стороны, лептин, действуя как провоспалительный цитокин, способствует переключению с Th2- на Th1-иммунный ответ. Известно, что успешная беременность связана с Th2-ответом. Другими словами, повышенный уровень лептина может усиливать воспалительный ответ в организме матери при беременности.

Следует отметить, что индивидуальные значения содержания лептина не более чем в 1,5 раза превышали среднюю величину соответствующего показателя контрольной группы, что вписывается в определение так называемого низкоуровневого воспаления (low grade inflammation). Специфика этого воспаления такова, что оно

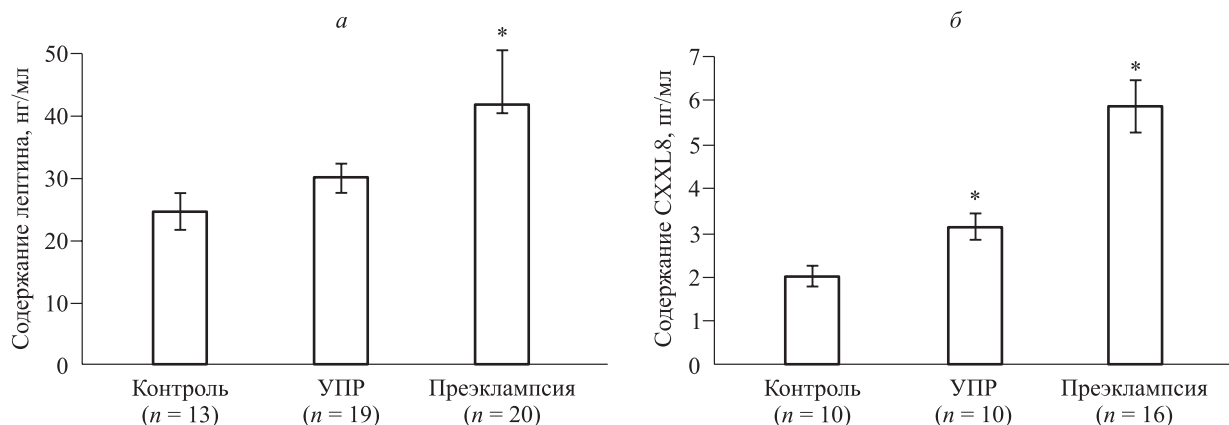


Рис. Содержание лептина (а) и CXCL8/ИЛ-8 (б) при угрозе преждевременных родов (УПР) и преэклампсии; * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$

протекает на фоне иммуносупрессии, осуществляемой плацентой. Источник лептина также не ясен. Можно предполагать, что таковым является плацента, так как все женщины имели нормальный индекс массы тела. Возможно и то, что в условиях преэклампсии увеличение уровня лептина необходимо для усиления миграции вневорсинчатого трофобласта, заблокированного воспалением. С этих позиций с учетом выявленных пациенток с повышенным и сниженным содержанием гормона можно формировать клинические группы с низким и высоким энергетическим обеспечением хода патологического процесса при учете того, что лептин является энергетическим регулятором, обеспечивающим нормальный ход беременности. Создается впечатление, что при всей полифункциональности лептина при различных патологиях больше задействованы те или иные его специфические функции, например, при угрозе преждевременных родов – торможение сокращения матки, при преэклампсии – стимуляция миграции вневорсинчатого трофобласта [6].

Уровень хемокина CXCL8 при угрозе преждевременных родов был достоверно повышен по сравнению с контрольной группой (рисунок, б), внутри группы индивидуальные показатели были более гомогенными по сравнению с лептином. Часто увеличение концентрации этого хемокина сопровождалось повышением содержания лептина. Функциональная значимость такого сочетания не понятна. Уровень CXCL8 при преэклампсии был еще более высоким, чем при угрозе преждевременных родов (см. рисунок, б; $p < 0,001$).

Таким образом, уровень хемокина CXCL8 повышается как при угрозе преждевременных родов, так и при преэклампсии. CXCL8, хемоаттрактант и активатор нейтрофилов [9], является одним из главных хемоаттрактантов, синтезируемых клетками миометрия нижнего сегмента матки для привлечения нейтрофилов в этот регион с целью размягчения шейки матки и индукции родов [11]. Мигрировавшие нейтрофилы осуществляют ремоделирование внеклеточного матрикса, подготавливая тем самым матку к родам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что, с одной стороны, лептин, тормозя сократительную активность матки, противостоит угрозе преждевременных родов, а с другой стороны, создает условия для воспаления, текущего по пути Th1, способствуя развитию преждевременных родов. CXCL8, стимулируя нейтрофилы, может запускать те или иные компоненты родов – усиление сокращения матки или разрыв

плодных мембран. В комплексе преобладание тех или иных факторов может вести или к пролонгированию беременности, или к преждевременным родам, что реально наблюдается в клинической практике. В перспективе CXCL8 и лептин можно рассматривать как потенциальные маркеры, которые можно использовать в комплексе с другими методами для оценки активности воспалительного процесса при угрозе преждевременных родов и при преэклампсии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Серов В.Н., Сухорукова О.И. Профилактика преждевременных родов // Рос. мед. журн. 2014. (1). 3–7.
2. Скрипченко Ю.П., Баранов И.И., Токова З.З. Статистика преждевременных родов // Проблемы репродукции. 2014. 20. (4). 11–14.
3. Трунов А.Н., Маринкин И.О., Кулешов В.М. и др. Активность местного воспалительного процесса в патогенезе бесплодия у женщин с хроническим воспалением органов репродуктивной сферы // Бюл. СО РАМН. 2014. (2). 56–60.
4. Щербаков В.И. Плацента и ее роль в патогенезе преэклампсии. Новосибирск: Изд-во СГУПС, 2012. 200 с.
5. Щербаков В.И., Рябиченко Т.И., Скосырева Г.А., Трунов А.Н. Механизмы внутриутробного программирования ожирения у детей // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. 2013. (5). 8–14.
6. Jovanovich M., Stefanoska I., Radojic L., Vicovac L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP9 and integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$ // Reproduction. 2010. 139. (4). 789–798.
7. Moynihan A.T., Hehir M.P., Morrison J.J. Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility *in vitro* // Am. J. Obstet Gynecol. 2006. 195. (2). 504–509.
8. Sykes L., Macintyre D. A., Teoh T.G., Bennet P.R. Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labor // Reproduction. 2014. 148. (2) S29–40.
9. Talbot H., Delaney A., Zhang P. et al. Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion // Reproduction. 2014. 148. (1). 21–31.
10. Wendremaire M., Mourtialon P., Goirand F. et al. Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced remodeling in an *in vitro* model of human myometrial inflammation // Biol. Reprod. 2013. 88. (2). 55–60.
11. Young A., Thomson A.J., Ledingham M.A. et al. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term // Biol. Reprod. 2002. 66. (2). 445–449.

STUDYING OF ENERGY BALANCE REGULATORS – LEPTIN AND CXCL8 CHEMOKIN LEVELS UNDER CONDITION OF PREMATURE BIRTH THREATENING AND AT PREECLAMPSIA

**Vladimir Ivanovich SHCHERBAKOV¹, Ivan Mikhaylovich POZDNYAKOV^{2,3},
Anna Vladimirovna SHIRINSKAYA³, Mikhail Valentinovich VOLKOV⁴**

¹ *Research Institute of Experimental and Clinical Medicine
630117 Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *Novosibirsk State medical University of Minzdrav of Russia
630091 Novosibirsk, Krasny av., 52*

³ *Novosibirsk Perinatal Center
630089 Novosibirsk, A. Lezhena str., 32*

⁴ *Maternity Hospital № 2
630008 Novosibirsk, Chekhov str., 76*

The levels of leptin and CXCL8 chemokine in case of premature birth have been investigated. 67 pregnant women under condition of premature birth threatening and at preeclampsia have been examined. It has been revealed that the leptin level tended to the elevation and CXCL8 content was significantly increased in case of threatening premature birth. Thereat, the values of both indexes were significantly higher than control levels at preeclampsia. The leptin low values were revealed in 10 % of premature birth threatening cases that testified to the increase in uterus contractile activity. The increased CXCL8 level activates neutrophils that works towards the premature birth induction. Both of these indicators can be recommended in a complex with other methods for pregnancy course forecasting in case of premature birth threatening.

Key words: premature birth, sterile inflammation, leptin, CXCL8, cytokines, chemokines.

Shcherbakov V.I. – doctor of medical sciences, researcher of laboratory of immunology, e-mail: Shcherbakov_VI@mail.ru

Pozdnyakov I.M. – doctor of medical sciences, professor of the chair for obstetrics and gynecology, the chief doctor

Shirinskaya A.V. – obstetrician-gynecologist, e-mail: anncharm2004@mail.ru

Volkov M.V. – obstetrician-gynecologist, e-mail: michaelis67@mail.ru

РОБОТ-АССИСТИРОВАННЫЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА В ТОРАКАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ (ПЕРВЫЙ ОПЫТ)

Александр Сергеевич КУДРЯВЦЕВ¹, Сергей Валерьевич ЯРМОЩУК¹,
Евгений Александрович ДРОБЯЗГИН^{1,2}, Алексей Николаевич АРХИПОВ¹,
Евгений Сергеевич ПОЛОВНИКОВ¹, Юрий Владимирович ЧИКИНЕВ²

¹ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России,
Центр онкологии и радиохирургии
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15, корп. 1

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

Цель исследования – оценка возможности выполнения и ближайших результатов робот-ассистированных вмешательств в торакальной хирургии. С использованием системы da Vinci оперированы 14 пациентов (метастатическое поражение легкого у 8, периферический рак легкого у 3, опухоль переднего средостения у 3). Осложнений во время операции и в послеоперационном периоде не отмечено, результаты указывают на высокую эффективность и безопасность робот-ассистированных вмешательств, что важно в онкологической практике.

Ключевые слова: робот-ассистированные вмешательства, роботическая торакальная хирургия, опухоли легких и средостения, роботические вмешательства при опухолях легких и средостения.

Малоинвазивные вмешательства в торакальной хирургии применяются с начала двадцатого века, первая торакоскопия выполнена в 1903 г. шведским врачом Г.Х. Якобеусом для выполнения осмотра плевральной полости и проведения плевротомии [1]. Начало 90-х годов XX в. отмечено бурным развитием торакоскопической и видеоассистированной торакоскопической хирургии. Внедрены в клиническую практику такие вмешательства, как атипичная резекция легкого, лоб- и пульмонэктомия, экстирпация пищевода и удаление опухолей средостения [1]. Безусловными преимуществами торакоскопической хирургии и видеоассистированной торакоскопической хирургии (VATS) перед открытыми вмешательствами являются меньшая выраженность болевого синдрома и необходимость использования наркотических анальгетиков в раннем послеоперационном периоде, меньшая длительность на-

хождения в стационаре, быстрая реабилитация и лучший косметический эффект [1, 2]. Но все же торакоскопические вмешательства имеют определенные ограничения. По данным американских исследователей, около 70 % торакоскопических вмешательств при I стадии рака легких все равно переходят в стандартную операцию или VATS [1].

Около 45 % лобэктомий, по данным американской ассоциации торакальных хирургов, выполняются в видеоассистированном варианте в связи с меньшей мобильностью инструментов, установленных через порты в межреберьях, что уменьшает объем движений и создает трудности выполнения лимфодиссекции [2].

Все чаще в зарубежной литературе появляются публикации о применении робот-ассистированных вмешательств при опухолях легких [3, 4, 7] и средостения [6]. Внедрение в клиническую практику робот-ассистированных вмеша-

Кудрявцев А.С. – торакальный хирург отделения радиотерапии, e-mail: kydas@mail.ru

Ярмощук С.В. – хирург-онколог отделения радиотерапии, e-mail: kydas@mail.ru

Дробязгин Е.А. – д.м.н., проф. кафедры госпитальной и детской хирургии лечебного факультета, ведущий научный сотрудник центра онкологии и радиохирургии, e-mail: evgenyidrob@inbox.ru

Архипов А.Н. – к.м.н., кардиоторакальный и сердечно-сосудистый хирург отделения детской кардиохирургии и центра хирургии новорожденных, e-mail: a.arkhipov@meshalkin.ru

Половников Е.С. – к.м.н., руководитель центра онкологии и радиохирургии, ассистент кафедры онкологии лечебного факультета, e-mail: e_polovnikov@nrcp.ru

Чикинев Ю.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной и детской хирургии лечебного факультета, главный торакальный хирург МЗ НСО, e-mail: chikinev@inbox.ru

тельств позволяет выполнять данные операции в торакоскопическом варианте. Применение робот-ассистированных вмешательств с возможностью 3D-изображения обеспечивает лучшую визуализацию по сравнению с традиционными и эндоскопическими вмешательствами. Возможность изгиба движущейся части инструментов позволяет улучшить ближайшие результаты операции и уменьшить число интраоперационных осложнений [5].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

За период с мая 2014 по июль 2015 г. в отделении Новосибирского НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина робот-ассистированные вмешательства выполнены 14 пациентам (семи мужчинам и семи женщинам) в возрасте от 42 до 77 лет. Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в табл. 1. Показаниями к оперативному вмешательству были опухоли легкого и средостения (табл. 2, 3).

Все вмешательства выполнялись с помощью хирургической системы da Vinci (Intuitive Surgical, США), которая имеет усиленное 3D высокой четкости, систему технического зрения и особенные endowrist-инструменты, сгибающиеся и вращающиеся намного больше, чем запястье человека, что позволяет врачу оперировать с улучшенным видением, точностью, ловкостью и контролем. Система da Vinci состоит из консоли, за которой сидит оперирующий хирург, и непосредственно робота-манипулятора, снабженного 3 «руками» и «рукой» для оптики. Таким образом, на грудной стенке делалось 4–5 разрезов длиной не более 1,5 см для введения 3–4 портов для робота и дополнительного ассистентского порта. Хирург имеет полный контроль над системой da Vinci, который передается с его рук в меньшие и более точные движения крошечных инструментов внутри тела больного.

Для проведения атипичной резекции легкого и удаления небольших опухолей средостения (до 4,0 см) помимо порта для оптики нами устанавливались два порта-манипулятора («руки робота») и ассистентский порт. В ряде случаев (у четырех пациентов) вмешательства выполнялись без ассистентского порта.

Установка портов («руки робота») зависела от локализации патологического процесса в грудной клетке. При хирургическом лечении опухолей средостения больной находился в положении на спине с отведенной вниз и немного латерально верхней конечностью со стороны введения роботического инструментария. «Оптическая рука» робота вводилась в IV или V межреберье по пе-

Таблица 1

Распределение пациентов по возрасту и полу

Возраст, лет	Мужчины, n	Женщины, n	Всего, n
41–50	2	2	4
51–60	3	1	4
61–70	1	2	3
71–80	1	2	3
Всего, n	7	7	14

Таблица 2

Распределение пациентов по нозологическим формам

Заболевание	Количество пациентов
Рак почки. Одиночный метастаз в легкое	2
Рак матки. Одиночный метастаз в легкое	1
Метастатическое поражение легких без первичного очага	4
Периферический рак легкого с метастазом в противоположное легкое	1
Периферический рак легкого	3
Опухоль переднего средостения	3

Таблица 3

Распределение пациентов по локализации патологического процесса в легочной ткани

Локализация опухолевого процесса		Количество пациентов
Правое легкое	Верхняя доля	4
	Средняя доля	2
	Нижняя доля	1
Левое легкое	Верхняя доля	2
	Нижняя доля	1
	Верхняя и нижняя доли	1

редней или средней подмышечной линии (в зависимости от конституциональных особенностей больного). «Руки робота» устанавливались под оптическим контролем: первая рука робота вводилась на два межреберья выше и медиальнее оптики, вторая – на два межреберья ниже и медиальнее оптики; при необходимости третья рука вводилась в плевральную полость медиальнее второй руки на уровне того же межреберья. Ассистентский порт устанавливался между оптикой и 2-й рукой робота латеральнее на одно межреберье.

При хирургическом лечении опухолей легкого «оптическая рука» робота вводилась в V межре-

берье по передне-подмышечной линии, а «руки» работа – в плевральную полость под оптическим контролем в зависимости от топической локализации патологического очага. Ассистентский порт устанавливался также в зависимости от зоны резекции легочной ткани с учетом вводимого аппарата для эндоскопической резекции (сосудов, легочной ткани, бронха). Для удаления опухолей средостения более 4,0 см и выполнения лобэктомии помимо оптики и ассистентского порта устанавливались 3 порта для рук робота.

Анестезиологическое пособие при роботических хирургических торакальных операциях ничем не отличалось от полостных операций – однологочная вентиляция, сопровождающаяся общей комбинированной анестезией без эпидурального или паравerteбрального блока.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структура и характер выполненных вмешательств представлены в табл. 4. Осложнений в ходе операций не было. В одном случае выполнена атипичная резекция С 1-2 и С 6 легкого. Длительность оперативного вмешательства при атипичной резекции легкого составила 40–50 мин, при лобэктомии – 3–3,5 ч, при удалении опухоли переднего средостения – 1 ч 20 мин.

Фрагменты резецированного легкого, доля легкого и опухоль средостения извлеклись при расширении послеоперационной раны (место установки торакопорта). Обязательным являлось дренирование плевральной полости интраоперационно. В первые сутки после операции выполнялась рентгенография органов грудной клетки. Во всех случаях легкое было расправлено. Дренажи удалялись из плевральной полости на 1–3 сутки после вмешательства (в среднем на 2-е сутки).

Следует отметить, что в сравнении с торакоскопическими вмешательствами при патологии легких и средостения имеется ряд отличий как в технике вмешательства, так и в установке троака-

ров для инструментов, что описано выше. В частности, есть сложности при работе в переднем средостении при выделении больших массивов опухолевой ткани и удалении клетчатки средостения для большего радикализма вмешательства, особенно при опухолях переднего средостения с миастеническим синдромом. При вмешательствах по поводу злокачественных опухолей легких использование данной методики обеспечивает лучшую визуализацию. Особенно это касается этапа лимфодиссекции, который применяется у этой категории пациентов.

При патоморфологическом исследовании удаленных опухолей диагноз установлен во всех случаях: метастазы рака почки обнаружены у двух пациентов, метастазы рака матки – у одного, метастазы аденокарциномы (при отсутствии первичного очага) – у четырех, метастаз рака легкого – у одного, аденокарцинома легкого – у трех, тимомы высокой степени злокачественности – у трех. Нахождение пациентов в клинике в послеоперационном периоде при удалении тимомы и резекции легкого не превышало 4 дней, после лобэктомии – 7 дней.

Все пациенты выписаны из стационара в удовлетворительном состоянии для продолжения лечения. В сроки наблюдения до 3 месяцев с момента оперативного вмешательства состояние удовлетворительное.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные при лечении пациентов с онкологическими заболеваниями легких и средостения, указывают на высокую эффективность и безопасность робот-ассистированных вмешательств, что важно в онкологической практике. Мы уверены в том, что вмешательства такого рода являются эффективным способом лечения различной патологии органов грудной клетки, не требуя конверсии. Эта технология представляет собой абсолютно новым разделом малоинвазивной торакальной хирургии, на что указывает количество все возрастающих публикаций. Важным является проведение совместных исследований специалистов в робот-ассистированной хирургии, тщательный отбор пациентов с целью выработки новых стратегий выполнения этой категории вмешательств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boffa D.J., Kosinski A.S., Paul S. et al.* Lymph node evaluation by open or video-assisted approaches in 11,500 anatomic lung cancer resections // *Ann. Thorac. Surg.* 2012. 94. 347–353.

Таблица 4

Объем и характер выполненных вмешательств

Вид вмешательства		Количество пациентов
Атипичная резекция легкого	Справа	4
	Слева	4
Расширенная лобэктомия	Средняя доля справа	1
	Верхняя доля справа	2
Удаление опухоли переднего средостения		3

2. Ceppa D.P., Kosinski A.S., Berry M.F. et al. Thoracoscopic lobectomy has increasing benefit in patients with poor pulmonary function: A Society of Thoracic Surgeons database analysis // *Ann. Surg.* 2012. 256. 487–493.
3. Egberts J.H., Schlemminger M., Schafmayer C. et al. Robot-assisted minimally invasive lobectomy with systematic lymphadenectomy for lung cancer // *Zentralbl. Chir.* 2015. 140. (1). 15–16.
4. Gonzalez-Rivas D. Recent advances in uniportal video-assisted thoracoscopic surgery // *Chin. J. Cancer Res.* 2015. 27. (1). 90–93.
5. Kumar A., Asaf B.B. Robotic thoracic surgery: The state of the art // *J. Minim. Access Surg.* 2015. 11. (1). 60–67.
6. Mineo T.C., Ambrogi V. Video-assisted thoracoscopic thymectomy surgery: Tor Vergata experience // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2015. 63. (3). 187–193.
7. Yang C.F., D'Amico T.A. Open, thoracoscopic and robotic segmentectomy for lung cancer // *Ann. Cardiothorac. Surg.* 2014. 3. (2). 142–152.

ROBOTIC THORACIC SURGERY (FIRST EXPERIENCE)

**Alexandr Sergeevich KUDRYAVTSEV¹, Sergey Valer'evich YARMOSHCHUK¹,
Evgeniy Alexandrovich DROBYAZGIN^{1,2}, Alexey Nikolaevich ARKHIPOV¹,
Evgeniy Sergeevich POLOVNIKOV¹, Yurii Vladimirovich CHIKINEV²**

¹ *Research Institute of Circulation Pathology n.a. acad. EN Meshalkin of Minzdrav of Russia,
Center of Oncology and Radiosurgery
630055, Novosibirsk, Rechnunovskaya str., 15, building 1*

² *Novosibirsk State Medical University
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

The aim of the study: evaluation of the possibility of the robotic-assisted operations and immediate results of robotic-assisted operations in thoracic surgery. Materials and Methods: 14 patients (8 – metastatic tumors of lung, 3 – peripheral lung cancer, 3 – tumors of the anterior mediastinum) have been operated with Da Vinci system. Results: intraoperative and postoperative complications not occurred. The results testify to the high effectiveness and safety of the robotic-assisted operations.

Key words: robotic-assisted operations, robotic thoracic surgery, tumors of lungs and mediastinum, robotic operations with tumors of lungs and mediastinum.

Kudryavtsev A.S. – thoracic surgeon, oncologist of department of radiotherapy, e-mail: kydas@mail.ru
Yarmoshchuk S.V. – oncosurgeon of department of radiotherapy, e-mail: kydas@mail.ru
Droblyazgin E.A. – doctor of medical sciences, associate professor of department of hospital and children's surgery, thoracic surgeon, leading researcher; e-mail: evgenyidrob@inbox.ru
Arkipov A.N. – candidate of medical sciences, staff cardiothoracic and vascular surgeon of the pediatric cardiac surgery and newborn surgery center, e-mail: a.arkhipov@meshalkin.ru
Polovnikov E.S. – candidate of medical sciences, head of center of oncology and radiosurgery, assistant of department of oncology, e-mail: e_polovnikov@nricp.ru
Chikinev Yu.V. – doctor of medical sciences, professor, head of department of hospital and children's surgery, e-mail: chikinev@inbox.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОДИНАМИКИ В СОСУДАХ ГЛАЗА И ОРБИТЫ У ПАЦИЕНТОВ ИЗ ПОПУЛЯЦИИ РЕКИ ТЕЧА, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Людмила Дмитриевна МИКРЮКОВА

ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России
454076, г. Челябинск, ул. Воровского, 68а

Исучены показатели гемодинамики в сосудах глаза и орбиты у лиц, подвергшихся длительному низкоинтенсивному радиационному воздействию. Основная группа состояла из 25 пациентов с высокой дозой облучения на мягкие ткани (по TRDS-2000 доза облучения больше 0,4 Гр, средняя доза 0,3 Гр). Группу контроля составили 27 пациентов с низкой дозой облучения (от 0 до 0,02 Гр, средняя доза 0,01 Гр). Определяли показатели кровотока в глазничной артерии (ГА), центральной артерии сетчатки (ЦАС), задних коротких цилиарных артериях (ЗКЦА). Для оценки гемодинамики в сосудах глаза и орбиты в обеих исследуемых группах больших проводилась ультразвуковая доплерография (УЗДГ) с цветным доплеровским картированием, позволяющая оценить скорость кровотока в сосудах глазного яблока и орбиты, их кровенаполнение, определить величину пульсации. По данным УЗДГ сосудов глазного яблока и орбиты у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленный период отмечено снижение скоростных характеристик (V_{\max} в глазничной артерии, V_{\min} в задних коротких цилиарных артериях) и повышение индекса периферического сопротивления в последних. Полученные результаты свидетельствуют о региональных гемодинамических нарушениях при хроническом радиационном воздействии. На основе данных клинико-инструментальных исследований разработаны прогностические критерии развития отдельных форм глазной патологии у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, ультразвуковое дуплексное сканирование, глазничная артерия, центральная артерия сетчатки, катаракта.

Аварии на предприятиях атомной промышленности и испытания ядерного оружия в XX в. привели к радиоактивному загрязнению значительных территорий. От повторения подобных ситуаций мы не застрахованы и в настоящее время, последняя наиболее масштабная радиационная авария произошла в Японии на АЭС Фукусима-1 в 2011 г. Изучение последствий радиационного воздействия в отдаленном периоде остается актуальной проблемой [2, 11, 12, 17]. Установлено, что воздействие ионизирующей радиации является причиной развития патологических процессов в глазу при острых лучевых поражениях как в экспериментальных условиях, так и в клинической практике в результате радиационных аварий у лиц, переживших атомную бомбардировку в Хиросиме и Нагасаки, у профессионалов, занятых в атомной промышленности. Однако в мировой литературе очень мало сведений о последствиях хронического длительного комбинированного (внешнего и внутреннего) воздействия ионизирующей радиации на развитие офтальмопатологии у населения в различные сроки жизни.

Изучение показателей гемодинамики в сосудах глаза и орбиты проводилось у пациентов клиники Уральского научно-практического центра радиационной медицины, занимающегося исследованиями риска отдаленных последствий хронического облучения в результате загрязнения реки Теча жидкими радиоактивными отходами ПО «Маяк» в период 1950–1956 гг. [11]. Когорта реки Теча включает около 30 тыс. человек, являвшихся постоянными жителями в одном из 41 прибрежного села реки Теча в период с 01.01.1950 по 31.12.1960 г. Более 80 % членов когорты проживали в прибрежных селах в период максимальных сбросов (с 1950 по 1952 г.). В течение периода наблюдения с 1950 по 2003 г. средняя кумулятивная доза на мышечную ткань, рассчитанная по дозиметрической системе TRDS-2009, для членов когорты составила 30 мГр, а максимальная – 510 мГр [9, 15]. Доля женщин в когорте составляла 58 %, мужчин – 42 %. К началу облучения около 40 % членов когорты были моложе 20 лет [11].

Микрюкова Л.Д. – к.м.н., научный сотрудник эпидемиологической лаборатории, врач-офтальмолог высшей категории клинического отделения, e-mail: mik@urcrm.ru

Считается, что облучение ускоряет и учащает отдаленную сосудистую патологию [4, 9, 12]. В настоящее время благодаря развитию новых неинвазивных ультразвуковых методов появилась возможность детально изучить состояние кровотока в сосудах глазного яблока, так как генез зрительных расстройств часто связан с нарушениями циркуляции в этом сосудистом бассейне [3, 7–10]. В офтальмологической практике широко используется метод ультразвуковой доплерографии с цветным картированием (ЦДК), позволяющий визуализировать кровотоки в сосудах малого диаметра при наложении цвета на их двумерное изображение [13–15]. При этом применяется триплексный режим сканирования – сочетание импульсно-волновой доплерографии, сканирования в режиме серой шкалы и цветового кодирования по скорости ЦДК и по энергии энергетического доплера.

Цель исследования – изучение состояния гемодинамики в сосудах глаза и орбиты у лиц, подвергшихся длительному низкоинтенсивному радиационному воздействию, в сравнении с контрольной группой и с возрастной нормой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В стационаре Уральского научно-практического центра радиационной медицины проведено углубленное клинико-функциональное обследование двух групп пациентов из когорты облученных на реке Теча. Основная группа состояла из 25 пациентов с высокой дозой облучения на мягкие ткани (по TRDS-2000 доза облучения больше 0,4 Гр, средняя доза 0,3 Гр). Группу контроля составили 27 пациентов с низкой дозой облучения (от 0 до 0,02 Гр, средняя доза 0,01 Гр). Критериями включения пациентов для углубленного офтальмологического обследования в отдаленные сроки служила доза облучения, возраст, а также отсутствие грубой соматической и глазной патологии. Для обследования выбирались лица, сопоставимые в обеих группах по полу, возрасту и национальности. Наибольшие трудности составлял выбор больных с высокой дозой облучения, так как таких пациентов немного, и они часто имеют другие сопутствующие заболевания. Пациенты из основной группы с высокой дозой облучения были несколько старше, чем в группе контроля (в первой группе средний возраст на начало воздействия (1950 г.) – 11,1 года, во второй, соответственно – 7,3 года). В группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в высокой дозе, средний возраст составил $63,1 \pm 2,6$ года. Индивидуальные значения колебались в пределах от 56 до 68 лет. Половой со-

став не был равномерным: 15 мужчин (60 %) и 10 женщин (40 %). Средний возраст в контрольной группе составил $58,7 \pm 3,9$ года с разбросом максимального и минимального значений от 56 до 66 лет. В нее вошли 13 мужчин (52 %) и 14 женщин (48 %).

Оценка клинического состояния проводилась по результатам осмотра и обследования терапевтом, офтальмологом и другими специалистами (по показаниям) во время госпитализации. От всех пациентов получено добровольное информированное согласие на проведение обследования, которое включало осмотр больного, изучение соматического статуса, терапевтическое обследование, полное офтальмологическое обследование по стандартизированной программе, исследование порога электрической чувствительности и электрической лабильности зрительного нерва, электроретинографию.

Измерения показателей гемодинамики в сосудах глаза и орбиты проводились на базе отделения ультразвуковой диагностики Челябинского областного диагностического центра д.м.н. Е.А. Катковой, в качестве нормальных возрастных значений использованы показатели из монографии [7]. Для оценки гемодинамики проводилась ультразвуковая доплерография (УЗДГ) с цветным доплеровским картированием, позволяющая оценить скорость кровотока в сосудах глазного яблока и орбиты, их кровенаполнение, определить величину пульсации. Исследования выполнялись на многоцелевой диагностической системе «Hitachi EUB-6500» с использованием линейного датчика с диапазоном частот от 6,5 до 13 МГц в импульсном доплеровском режиме. В качестве наиболее информативных показателей для оценки кровоснабжения в орбите и глазном яблоке рассматривались показатели кровотока в таких сосудах, как глазничная артерия (ГА), центральная артерия сетчатки (ЦАС), задние короткие цилиарные артерии (ЗКЦА). Доплеровские показатели потоков во всех сосудах определяли в спектральном доплеровском режиме с соблюдением общих требований к проведению доплеровских измерений [6, 7, 10]. При проведении измерений в спектральном доплеровском режиме в артериях определяли пиковую систолическую скорость кровотока (V_{max}), конечную диастолическую скорость кровотока (V_{min}), усредненную по времени максимальную скорость кровотока (V_{med}), рассчитывали индекс периферического сопротивления (RI). Гемодинамические характеристики определяли в ЦАС не дальше 10–12 мм от заднего полюса глазного яблока, в ГА на отрезке до образования ее дуги над зрительным нервом. В ЗКЦА доплерографические характеристики

регистировались в 0,3–0,7 мм от заднего полюса глазного яблока.

У большинства пациентов в обеих исследуемых группах при осмотре терапевтом установлены соматические диагнозы, чаще всего это наиболее распространенные в данной возрастной группе гипертония различной степени и остеохондроз позвоночника. У 13 (52 %) больных в основной группе диагностирована гипертония различной степени тяжести, у 10 (40 %) – гипертония с явлениями ишемической болезни сердца. В контрольной группе таких пациентов было соответственно 15 (55,5 %) и 7 (25,9 %). Церебральный атеросклероз выявлен у 3 больных из основной группы, в контрольной группе пациентов с таким диагнозом нет. Остеохондроз различных отделов позвоночника или распространенный остеохондроз диагностирован у 8 лиц (32 %) основной группы. Но при наличии различных видов хронических заболеваний на момент проведения обследования у всех пациентов состояние расценивалось как удовлетворительное, обострения хронических заболеваний не наблюдалось.

Самая частая патология связана в первую очередь с возрастными изменениями – это патология сосудистой системы глаза и изменения хрусталика. В основной группе при клиническом обследовании чаще отмечается ангиосклероз сосудов сетчатки (40,0 % от всех обследованных, в контрольной группе – 22,2 %, $p = 0,05$), гипертоническая ангиопатия сетчатки диагностировалась чаще у пациентов с низкой дозой облучения (55,5 %, в контрольной группе – 44,0 %, $p < 0,05$). У части пациентов обеих исследуемых групп диагностирована инволюционная катаракта. Патологических изменений в хрусталике не выявлено только у 16 человек из всех 52 обследованных: в 12 глазах в основной группе и в 16 глазах из группы контроля.

Таким образом, обе исследуемые группы – это пациенты 56–68 лет, не имеющие грубых соматических заболеваний, которым было проведено полное офтальмологическое обследование. Существенных различий по остроте зрения и видам рефракции не установлено. Статистически значимым оказалось превышение числа диагностированных случаев ангиосклероза сетчатки у пациентов основной группы по сравнению с контролем. При биомикроскопическом исследовании хрусталика лиц основной группы выявлено большее количество помутнений в передней капсуле по сравнению с группой контроля. Также достоверно выше в основной группе число пациентов, имеющих желтоватую окраску хрусталика. Наиболее часто в исследуемых группах наблюдалась начальная катаракта с типичными помутнениями

в кортикальных слоях и в виде спиц по периферии (16 глаз в контрольной группе и 11 глаз в основной группе), установлены изменения в области задней капсулы хрусталика (5 глаз в контрольной группе и на 9 глазах в основной группе). Также небольшое превышение имело число изменений в хрусталике: на 2 глазах в основной группе и на одном глазу в контрольной обнаружена цветная переливчатость в задней капсуле хрусталика, в 20 и 12 случаях соответственно – желтоватая окраска хрусталика.

Для обработки результатов исследований использовались методы вариационной статистики с определением средней арифметической (M), стандартной ошибки среднего арифметического (m), среднеквадратичного отклонения (σ). Для оценки различий средних значений двух независимых выборок, имеющих нормальное распределение, использовался параметрический критерий Стьюдента. При отклонении от нормального распределения, а также при малом объеме выборки использовался непараметрический U-тест Манна–Уитни и двухфакторный тест Колмогорова–Смирнова для двух независимых выборок. Различия считались достоверными при $p < 0,05$ [1, 5]. Математический алгоритм, позволяющий спрогнозировать развитие катаракты, был разработан с помощью методов логистической регрессии и дискриминантного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При качественной оценке анализа доплеровского сдвига частот форма доплеровской кривой, зарегистрированной в ГА, имела характерный бифазный вид с выраженной инцизурой. Систолический пик был несколько сглажен, отмечалось выраженное спектральное расширение. Доплеровская кривая в ЦАС и ЗКЦА была типичной для артерий с низким периферическим сопротивлением. В большинстве случаев наблюдался непрерывный монофазный поток с уплощенным систолическим пиком.

Из представленных в таблице результатов исследования следует, что в ГА по V_{\max} наблюдаются статистически значимые различия в обеих группах облученных по сравнению с нормой. По всем другим показателям гемодинамики как между исследуемыми группами, так и в сравнении с нормой различий не получено. Однако у пациентов с высокой дозой облучения отмечается более низкие показатели V_{\min} в сочетании с повышенным RI. Это может указывать на тенденцию к повышению периферического сопротивления в ГА. При анализе доплеровского спектра антеградного кровотока форма пиковой систолической волны

Таблица

Средние гемодинамические показатели кровотока ($M \pm m$)

Показатель	ГА			ЦАС			ЗКЦА		
	Основная группа, $n = 50$	Группа контроля, $n = 54$	Норма [7]	Основная группа, $n = 50$	Группа контроля, $n = 54$	Норма [7]	Основная группа, $n = 50$	Группа контроля, $n = 54$	Норма [7]
V_{\max} , см/с	$36,09 \pm 1,31^*$	$36,73 \pm 1,68^*$	$40,21 \pm 0,86$	$12,53 \pm 0,57$	$12,47 \pm 0,46$	$13,20 \pm 0,77$	$13,27 \pm 0,66$	$12,49 \pm 0,47^*$	$13,99 \pm 0,64$
V_{\min} , см/с	$9,51 \pm 0,65$	$10,89 \pm 1,04$	$10,88 \pm 0,65$	$2,91 \pm 0,18$	$3,17 \pm 0,22$	$3,88 \pm 0,48$	$3,99 \pm 0,25^*$	$3,88 \pm 0,22^*$	$4,54 \pm 0,29$
$V_{\text{мед}}$, см/с	$19,53 \pm 0,94$	$21,04 \pm 1,08$	$19,04 \pm 0,78$	$6,78 \pm 0,32$	$7,12 \pm 0,32$	$6,35 \pm 0,44$	$8,16 \pm 0,39$	$7,66 \pm 0,31$	$7,42 \pm 0,49$
RI	$0,738 \pm 0,013$	$0,722 \pm 0,014$	$0,729 \pm 0,018$	$0,764 \pm 0,010^*$	$0,753 \pm 0,010$	$0,704 \pm 0,033$	$0,712 \pm 0,016^{* \#}$	$0,685 \pm 0,014$	$0,670 \pm 0,027$

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей. * – в норме, # – в группе контроля.

сглажена в 3 случаях в основной группе, в 5 – в контрольной группе больных.

Из всех проведенных исследований кровотока в ЦАС можно отметить статистически значимое увеличение индекса резистентности в основной группе в сравнении с возрастной нормой. У пациентов основной группы отмечены более низкие значения минимальной скорости кровотока в ЦАС в сравнении с группой контроля и, особенно, в сравнении с возрастной нормой, но эти различия были статистически недостоверными. У пациентов с низкой дозой облучения регистрировались более низкие значения V_{\max} , V_{\min} и увеличение RI. Эти различия также были статистически недостоверными.

Изменения гемодинамических показателей в ЗКЦА установлены в обеих исследуемых группах. Минимальная скорость кровотока в ЗКЦА снижена по сравнению с нормой у пациентов обеих исследуемых групп ($p < 0,05$), но между группами статистически значимых различий не выявлено. В контрольной группе достоверно снижена также максимальная скорость в ЗКЦА ($p < 0,05$). У пациентов основной группы отмечается статистически значимое увеличение индекса периферического сопротивления ($p \leq 0,05$). Низкие показатели V_{\min} в сочетании с повышенным RI указывают на выраженную тенденцию к увеличению периферического сопротивления в ЗКЦА.

Из всех показателей гемодинамики по данным УЗДГ статистически достоверным у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, является снижение V_{\max} в глазничной артерии. В целом средние гемодинамические показатели в обеих исследуемых группах сопоставимы и не отличаются значительно от возрастной нормы ($p > 0,05$). При изучении показателей кровотока отмечается увеличение периферического сосудистого сопротивления во всех сосудах (ГА, ЦАС, ЗКЦА). Более выраженные изменения периферического сосудистого сопротивления выражены в ЗКЦА (в 28 случаях). Это повышение RI сочетается со статистически достоверным снижением V_{\min} , что доказывает увеличение периферического сопротивления в ЗКЦА у пациентов основной группы в сравнении со значениями возрастной нормы. По другим гемодинамическим показателям по данным УЗДГ сравниваемые группы значимо не различались как между собой, так и по сравнению с нормой.

На основе данных клинко-инструментальных исследований мы попытались рассчитать прогностические критерии развития отдельных форм глазной патологии у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. Хрусталик глаза является одной из наиболее ра-

диочувствительных тканей организма [2, 12, 17]. При сравнении радиочувствительности различных тканей глаза детектируемые изменения хрусталика отмечаются в диапазоне доз 0,2–0,5 Гр, тогда как глазная патология в других тканях развивается при остром или фракционированном облучении в диапазоне 5–20 Гр. Для определения прогностически значимых показателей развития катаракты по данным исследования проведен сравнительный анализ инструментальных показателей гемодинамики, данных электрофизиологического и клинического обследования у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в высокой и низкой дозе облучения. Анализ проводился с помощью методов логистической регрессии и дискриминантного анализа. Как при обработке данных пошаговым методом логистической регрессии, так и при дискриминантном анализе статистически значимым оказался возраст на момент обследования, также RI в ЗКЦА.

Уравнение имеет вид

$$B(x) = 0,321a + 5,765RI - 23,425,$$

где a – возраст на момент обследования; RI – индекс резистентности в ЗКЦА.

Вероятность наличия катаракты определяется уравнением

$$P = 1/(1 + e^{-B(x)}).$$

С помощью метода дискриминантного анализа был разработан математический алгоритм, позволяющий по исходным значениям переменных «возраст на момент обследования» и «RI в ЗКЦА» отнести пациента к группе возможного риска развития катаракты. Уравнение дискриминирующей функции имело следующий вид:

$$F(x) = 0,261a + 3,751RI - 503,859,$$

где a – возраст на момент обследования; RI – индекс резистентности в ЗКЦА

Значения F меньше 0,194 свидетельствовали о вероятном наличии катаракты.

По результатам анализа правильно классифицированы 75 % всех случаев. Наличие катаракты прогнозируется при этом с вероятностью 81,8 %.

ВЫВОДЫ

1. По данным УЗДГ сосудов глазного яблока и орбиты у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленный период отмечено снижение скоростных характеристик (V_{\max} в глазничной артерии, V_{\min} в задних коротких цилиарных артериях) и повышение индекса периферического сопротивления (RI) в последних. Полученные результаты свидетельствуют о

региональных гемодинамических нарушениях при хроническом радиационном воздействии.

2. Прогностическое значение для развития катаракты имеют возраст и значение индекса резистентности (RI) в задних коротких цилиарных артериях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбом А., Норелл С. Введение в современную эпидемиологию. Таллин, 1996. 122 с.
2. Альбрехт М. Келлер Радиационные исследования на Южном Урале. Переоценка текущего состояния. Комментарии // Мед. радиология и радиационная безопасность. 2003. (3). 64–78.
3. Бровкина А.Ф. Болезни орбиты. М., 2008. 256 с.
4. Воробьев Е.И., Степанов Р.П. Ионизирующее излучение и кровеносные сосуды. М.: Энергоатомиздат, 1985. 296 с.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
6. Зубарев А.Р., Григорян Р.А. Ультразвуковое ангиосканирование. М., 1991. 175 с.
7. Катькова Е.А. Диагностический ультразвук. Офтальмология: Практическое руководство / ред. А.В. Зубарев. М.: СТРОМ, 2002. 120 с.
8. Киселева Т.Н., Пантелева О.Г., Шамшинова А.М. Кровоток в сосудах глаза и орбиты у больных эндокринной офтальмопатией // Вестн. офтальмологии. 2007. (1). 33–36.
9. Котова Э.С. Состояние сосудов глаза у здоровых людей и у лиц, подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации // Бюл. радиационной медицины. 1962. (5). 69–73.
10. Лелюк В.Г., Лелюк С.Э. Ультразвуковая ангиология. 3-е изд. М.: Реал Тайм, 2007. 416 с.
11. Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Теча / ред. А.В. Аклеев, М.Ф. Киселев. 2-е изд., испр. и доп. М., 2001. 530 с.
12. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений. М.: Медицина, 1991. 464 с.
13. Харлап С.И., Шершнев В.В. Гемодинамические характеристики центральной артерии сетчатки и глазничной артерии при атеросклеротическом поражении сонных артерий по данным ультразвуковых методов исследования // Вестн. офтальмологии. 1998. (5). 39–43.
14. Хокканен В.М., Чудинова О.В. Ультразвуковая доплерография в диагностике и клинике увеитов. СПб., 2007. 128 с.
15. Dennis K.J., Dixon R.D., Winsberg F. et al. Variability in measurement of central retinal artery velocity using color Doppler imaging // J. Ultrasound Med. 1995. (14). 463–466.

16. Kozobolis V.P., Detorakis E.T., Konstas A.G. Retrobulbar blood flow and ophthalmic perfusion in maximum dynamic exercise // Clin. Exp. Ophthalmol. 2008. (36). 123–129.

17. Neriishi K., Nakashima E., Minamoto A. et al. Postoperative cataract cases among atomic bomb survivors: radiation dose response and threshold // Radiat. Res. 2007. (168). 404–408.

STUDIES OF THE RATES OF HEMODYNAMICS IN THE EYE BLOOD VESSELS AND THE EYE-SOCKETS IN PATIENTS CHRONICALLY EXPOSED TO RADIATION

Lyudmila Dmitrievna MIKRYUKOVA

*Urals Scientific and Practical Center for Radiation Medicine
454076, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 68a*

The characteristics of the hemodynamics of the eye and the eye-socket vessels in persons with a history of a long-term low-intensity radiation exposure were studied. The main group consisted of 25 patients with high exposure doses to soft tissues (based on the TRDS-2000 data, the exposure doses exceeded 0.4 Gr and the medium doses amounted to 0.3 Gr. The control group included 27 patients with low exposure doses (from 0 to 0.02 Gr), the medium dose was equal to 0.01 Gr. The blood flow characteristics were assessed in the ophthalmic artery (OA), the central artery of the retina (CAR), and in the rear short ciliary arteries (RSCA). In order to evaluate the hemodynamics in the eye vessels and in the eye-socket, the ultrasonic dopplerography with color Doppler imaging of orbital vessels was used which allowed to estimate the blood circulation time in the vessels of the eyebulb and the eye-socket, and the blood supply to them, and also, to estimate the pulsation rate. According to the data on color Doppler ultrasonic imaging of the eye and orbit in persons chronically exposed to radiation during the late period after the beginning of the exposure decreased blood velocity characteristics were noted (V_{max} in the ophthalmic artery, V_{min} in the rear short ciliary arteries) and an increased index of the peripheral resistance (RI) in the last ones. The results obtained testify to the regional hemodynamic abnormalities in cases of chronic radiation exposures. Based on the data of the clinical and instrumental examinations, prognostic criteria for the development of particular forms of eye pathology in persons chronically exposed to radiation have been developed.

Key words: ionizing radiation, ultrasound Doppler echocardiography, ophthalmic artery, central retinal artery, cataract.

Mikryukova L.D. – candidate of medical sciences, researcher of epidemiological, e-mail: mik@urcrm.ru

**ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
КОРЕННОГО И ПРИШЛОГО НАСЕЛЕНИЯ ЯМАЛО-НЕНЕЦКОГО
АВТОНОМНОГО ОКРУГА**

Лев Михайлович ПОЛЯКОВ¹, Александр Анатольевич РОЗУМЕНКО¹,
Людмила Павловна ОСИПОВА², Валерий Георгиевич КУНИЦЫН¹,
Татьяна Владимировна ГОЛЬЦОВА¹

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт биохимии
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

Цель настоящего исследования – изучение основных показателей липидного обмена у представителей коренного (лесные и тундровые ненцы) и пришлого населения, проживающего в районных поселках Ямало-Ненецкого автономного округа. Определяли содержание общего холестерина, холестерина липопротеидов очень низкой, низкой и высокой плотности, триглицеридов, свободных жирных кислот, а также индекс атерогенности. Показано, что основные показатели липидного обмена у представителей коренного населения находятся в пределах референсных значений нормы. Отличительной особенностью липидного спектра сыворотки крови у коренных жителей (мужчин и женщин) по сравнению с пришлым населением являлось преобладание антиатерогенных фракций и близкое к норме значение индекса атерогенности.

Ключевые слова: холестерин, липидный обмен, Ямало-Ненецкий автономный округ, коренное население, пришлое население.

Исследования особенностей липидного обмена у коренного и пришлого населения Севера, несмотря на значительное количество публикаций, посвященных данному вопросу, до сих пор являются актуальными. У коренных жителей приполярных районов по сравнению с пришлыми исследователи отмечают более низкие значения содержания в сыворотке крови общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), липопротеидов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП) на фоне повышенного содержания липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [4, 5, 8]. Такой благоприятный липидный профиль, по мнению ряда исследователей, обуславливает более низкую по сравнению с пришлыми жителями частоту сердечно-сосудистой патологии у коренных жителей Севера, придерживающихся традиционного уклада жизни и белково-жирового типа питания. Неблагоприятный липидный спектр крови у пришлого населения, а это наличие атерогенных дислипидемий, несомненно, связан с высоким риском развития

заболеваний сердечно-сосудистой системы и, в частности, ишемической болезни сердца. Так, у мужчин некоренной национальности, проживающих в Республике Саха (Якутии), при наличии коронарного атеросклероза выявлены более выраженные количественные и качественные изменения липидного спектра крови, чем у коренных жителей [2]. Следует отметить, что подобные различия обнаружены между нганасанами и русскими поселенцами Таймыра [1], между коренными (эвенки) и пришлыми жителями Эвенкии [3], между эскимосами и пришлыми жителями Гренландии [9, 11], инуитами и поселенцами Канады [1, 10]. Особенности состояния липидного обмена у коренного и пришлого населения Севера посвящено несколько монографий и обзоров [4, 5, 7, 8].

Целью нашей работы явилась сравнительная оценка показателей липидного обмена у представителей коренного (лесные и тундровые ненцы) и пришлого населения, проживающего в районных поселках Ямало-Ненецкого автономного округа.

Поляков Л.М. – д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru

Розуменко А.А. – к.б.н., e-mail: alexandr.rozumenko@gmail.com

Осипова Л.П. – к.б.н., e-mail: ludos77@yandex.ru

Кунцын В.Г. – д.б.н., e-mail: kunitsyn41@mail.ru

Гольцова Т.В. – ученый секретарь, e-mail: ibch@niibch.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в рамках договора о научном сотрудничестве с Институтом цитологии и генетики СО РАН. Объектом исследования являлись жители районных поселков Ямало-Ненецкого автономного округа. Обследовано 200 человек (126 женщин и 74 мужчин). Все участники обследования подписывали добровольное информированное согласие на участие в научном исследовании. Забор крови производили из локтевой вены в утренние часы, натощак, после 12-часового периода ночного голодания, методом венепункции в специальную стерильную вакуумную систему «BD Vacutainer» (Becton, Dickinson and Company, США). У обследованных в сыворотке крови определяли содержание ОХС, ХС ЛПОНП, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ, свободных жирных кислот (СЖК) на автоматическом анализаторе «Labsystem» (Финляндия) с использованием наборов «Bioson» (Германия), а также рассчитывали индекс (коэффициент) атерогенности как отношение (ОХС – ХС ЛПВП)/ХС ЛПВП.

Согласно рекомендациям экспертов Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК), уровень ОХС > 5,0 ммоль/л считали повышенным, гипертриглицеридемия оценивалась при уровне ТГ > 1,7 ммоль/л, повышенным считали содержание ХС ЛПНП более 3,0 ммоль/л, пониженным – уровень ХС ЛПВП менее 1,0 ммоль/л у мужчин и 1,2 ммоль/л у женщин [6].

Данные представлены в виде M (среднее значение) $\pm m$ (стандартная ошибка среднего значения). Величину уровня значимости различий (p) принимали равной 0,05, что соответствует критериям, принятым в медико-биологических исследованиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа, как нам представляется, является одной из уникальных попыток изучения состояния липидного спектра крови у представителей коренного и пришлого населения, проживающих в единых пространственно-временных координатах азиатского Севера. Результаты гендерных особенностей состояния липидного обмена этих двух этнических групп представлены в таблице.

Как следует из таблицы, содержание ОХС у представителей коренной национальности (мужчин и женщин) находится в пределах референсных значений нормы. Данный показатель у представителей пришлого населения, как у мужчин, так и у женщин, был статистически значимо выше, чем у коренных жителей, и согласно рекомендациям ВНОК (2012) может считаться повышенным. Подобная ситуация в липидном спектре наблюдалась и в содержании ХС ЛПОНП и ТГ, что, несомненно, говорит о наличии у пришлых жителей гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии: у мужчин оно было соответственно в 2,8 и 2,1 раза выше, чем у коренных, у женщин – на 34 и 31 % ($p < 0,05$). Связь этих двух параметров объяснима, поскольку ЛПОНП являются основной транспортной формой эндогенных ТГ крови.

Обращает на себя внимание совершенно противоположная направленность динамики содержания ХС ЛПВП и ТГ-богатых ЛПОНП у мужчин – представителей коренного и пришлого населения. Как следует из таблицы, в липидном спектре крови у коренных жителей-мужчин благоприятный повышенный уровень ХС ЛПВП сочетался с резко выраженными низкими значениями ТГ и ХС ЛПОНП. С другой стороны, у

Таблица

Показатели липидного спектра у представителей коренного и пришлого населения, проживающего в районных поселках Ямало-Ненецкого автономного округа

Показатель	Мужчины коренные (n = 42)	Мужчины пришлые (n = 28)	p	Женщины коренные (n = 89)	Женщины пришлые (n = 30)	p
Содержание ОХС, ммоль/л	4,62 ± 0,16	5,80 ± 0,29	0,0004	4,77 ± 0,11	5,39 ± 0,18	0,0063
Содержание ТГ, ммоль/л	0,99 ± 0,07	2,04 ± 0,32	0,0013	1,01 ± 0,07	1,31 ± 0,10	0,0004
Содержание ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,35 ± 0,05	0,97 ± 0,21	0,0128	0,53 ± 0,05	0,71 ± 0,14	0,0257
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л	2,92 ± 0,15	3,79 ± 0,26	0,0032	3,01 ± 0,11	3,47 ± 0,18	0,0207
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л	1,36 ± 0,07	1,05 ± 0,09	0,0027	1,23 ± 0,05	1,20 ± 0,05	> 0,05
Индекс атерогенности	2,40 ± 0,23	4,52 ± 1,29	< 0,0001	2,88 ± 0,23	3,73 ± 0,28	> 0,05
Содержание СЖК, ммоль/л	0,42 ± 0,04	0,62 ± 0,06	0,0060	0,45 ± 0,02	0,54 ± 0,04	0,0275

Примечание. p – уровень значимости различий показателя у представителей коренного и пришлого населения соответствующего пола.

пришлых мужчин относительно низкие значения ХС ЛПВП сочетались с высоким содержанием ТГ и ХС ЛПОНП ($p < 0,001$).

Механизмы снижения содержания в плазме крови атерогенных липопротеидов известны. Так, уменьшение в крови коренных жителей концентрации ТГ и ХС ЛПОНП, как нам представляется, объясняется увеличением липолиза липопротеидов, обогащенных триглицеридами (ЛПОНП), путем повышения активности липопротеидлипазы. Здесь важную роль кофактора играет входящий в состав ЛПОНП аполипопротеин С-II, что может приводить к увеличению доступности триглицеридов для липопротеидлипазы. Уменьшение уровня ТГ в плазме объясняется снижением обмена нейтральных липидов между фракциями ЛПОНП и ЛПВП [12], что, по-видимому, и является одним из возможных механизмов повышения ЛПВП.

Подобная закономерность прослеживалась и в отношении содержания в крови коренных жителей ХС ЛПНП. Так, у мужчин оно не превышало рекомендованный ВНОК уровень 3,0 ммоль/л и было статистически значимо ниже (на 30 %), чем у пришлых жителей мужского пола. Обращает на себя внимание близкий к норме уровень ХС ЛПНП у женщин коренной национальности.

Согласно рекомендациям экспертов ВНОК (2012), пониженным считается уровень ХС ЛПВП менее 1,0 ммоль/л у мужчин и 1,2 ммоль/л у женщин. Среднее значение этого показателя у ненцев было выше нормы (1,23 ммоль/л у женщин) и даже выше (1,36 ммоль/л у мужчин), что, несомненно, является благоприятным прогностическим признаком в отношении развития сердечно-сосудистой патологии. Такое благоприятное антиатерогенное соотношение отдельных компонентов липидного спектра у представителей обоего пола коренного населения подтверждает и расчет холестерина индекса атерогенности, величина которого была значительно (в 1,9 раза у мужчин в 1,3 раза у женщин) ниже, чем у некоренных жителей. Кроме того, у коренных жителей выявлен достоверно пониженный уровень СЖК ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. У представителей коренного населения (мужчин и женщин) обнаружено пониженное содержание в крови ОХС, ТГ, СЖК, ХС ЛПОНП и ХС ЛПНП по сравнению с представителями пришлого населения.

2. Индекс атерогенности липидного спектра крови у лиц обоего пола коренной национально-

сти находился в пределах референсных значений нормы (2,40 у мужчин и 2,88 у женщин), будучи значительно (в 1,9 и 1,3 раза) меньше, чем у некоренных жителей.

3. Динамика содержания ХС ЛПВП и ТГ-богатых ЛПОНП у мужчин – представителей коренного и пришлого населения, имеет совершенно противоположную направленность. В липидном спектре крови коренных жителей-мужчин повышенный уровень ХС ЛПВП сочетался с резко выраженными низкими концентрациями ТГ и ХС ЛПОНП. У пришлых мужчин относительно пониженный уровень ХС ЛПВП сочетался с высоким содержанием ТГ и ХС ЛПОНП ($p < 0,001$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влощинский П.Е. Состояние углеводного и жирового обменов у жителей Крайнего Севера, их взаимосвязь с факторами питания: дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск, 1998.

2. Воевода М.И., Романова А.Н., Рагино Ю.И., Семаева Е.В. Некоторые особенности факторов риска коронарного атеросклероза у жителей Якутии // Бюл. СО РАМН. 2010. 30. (3). 52–57.

3. Ноздрачев К.Г., Догадин С.А., Манчук В.Т. Распространенность факторов риска ИБС и показатели инсулинемии у коренных и пришлых жителей Эвенкии // Сиб. мед. журн. 2005. 50. (1). 74–78.

4. Панин Л.Е. Полярный метаболический тип // Вопросы экологии человека в условиях Крайнего Севера / Отв. ред. Л.Е. Панин. Новосибирск, 1979. 23–32.

5. Панин Л.Е. Фундаментальные проблемы приполярной и арктической медицины // Бюл. СО РАМН. 2013. 6. (1). 5–10.

6. Рекомендации экспертов всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и коррекции нарушений липидного обмена: 5-й пересмотр. М., 2012.

7. Севостьянова Е.В. Особенности липидного и углеводного метаболизма человека на Севере (литературный обзор) // Бюл. сиб. медицины. 2013. 12. (1). 93–100.

8. Соловей Л.И., Манчук В.Т. Север – человек: адаптивные модификации метаболизма липидов. Красноярск, 1998. 212 с.

9. Bang H.O., Dyeberg J. Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimos // Advanced Nutrition Research. N.Y.: Plenum Publishing Corp, 1980. 1–22.

10. Chateau-Degat M.-L., Dewailly E., Louchini R. et al. Cardiovascular burden and related risk factors among Nunavik (Quebec) Inuit: Insights from baseline findings in the circumpolar Inuit Health in Transition cohort study // Can. J. Cardiol. 2010. 26. (6). 190–196.

11. De Knijff P., Johansen L.G., Rosseneu M. et al. Lipoprotein profile of a Greenland Inuit population. Influence of anthropometric variables, Apo E and A4 polymorphism, and lifestyle // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1992. 12. 1371–1379.
12. Mann C.J., Yen F.T., Grant A.M., Bihain B.E. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia // *J. Clin. Invest.* 1991. 88. 2059–2066.

SERUM LIPID SPECTRUM OF INDIGENOUS AND ALIEN POPULATION OF YAMALO-NENETS AUTONOMOUS OKRUG

**Lev Mikhailovith POLYAKOV¹, Alexandr Anatolevich ROZUMENKO¹,
Ludmila Pavlovna OSIPOVA², Valery Georgievich KUNITSYN¹,
Tatyana Vladimirovna GOLTSOVA¹**

¹ *Institute of Biochemistry*
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

² *Institute of Cytology and Genetics*
63090, Novosibirsk, Akademik Lavrentev av., 10

The aim: the study of the main parameters of lipid metabolism in the indigenous (forest and tundra Nenets) and alien population living in regional villages of Yamalo-Nenets Autonomous Okrug. The content of total cholesterol, very low density, low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol, triglycerides, free fatty acids and atherogenic index have been determined. It is shown that the main parameters of lipid metabolism in the indigenous population are within the reference values of the norm. A distinctive feature of the serum lipid spectrum in the indigenous population (men and women) compared with non-indigenous is the prevalence of anti-atherogenic fractions and close to normal atherogenic index value compared with those in non-aboriginal population.

Key words: cholesterol, lipid metabolism, Yamal-Nenets Autonomous Okrug, indigenous population, alien population.

Polyakov L.M. – head of the laboratory of medical biotechnology, doctor of medical sciences, professor,
e-mail: plm@niibch.ru

Rozumenko A.A. – candidate of biological sciences, e-mail: alexandr.rozumenko@gmail.com

Osipova L.P. – candidate of biological sciences, e-mail: ludos77@yandex.ru

Kunitsyn V.G. – doctor of biological sciences, e-mail: kunitsyn41@mail.ru

Goltsova T.V. – scientific secretary, e-mail: ibch@niibch.ru