

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОКАРДА
ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ СЕРДЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Владимир Павлович НОВОСЕЛОВ¹, Сергей Владимирович САВЧЕНКО¹,
Александр Николаевич ПОРВИН¹, Дмитрий Алексеевич КОШЛЯК¹,
Владимир Эдуардович ЯНКОВСКИЙ², Александр Петрович НАДЕЕВ¹,
Татьяна Августовна АГЕЕВА¹, Юрий Владимирович ЧИКИНЕВ¹,
Алексей Станиславович ПОЛЯКЕВИЧ¹**

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

² Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России
656038, г. Барнаул, просп. Ленина, 40

Проведено исследование, целью которого явилось выявление изменений ультраструктуры кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда желудочков сердца при его механическом повреждении различной степени тяжести. Выполнено экспериментальное моделирование закрытого механического повреждения сердца на крысах породы Вистар с использованием оригинальной методики. Исследование показало, что при повреждении сердца в виде его ушиба в кардиомиоцитах происходит увеличение объемной плотности митохондрий, саркоплазматического ретикулума, лизосом и снижение объемной плотности рибосом и гликогена. В эндотелиоцитах миокарда наблюдается увеличение объемной плотности митохондрий и микропиноцитозных везикул, снижение объемной плотности рибосом. Выраженность этих изменений зависит от степени тяжести механического повреждения миокарда. Данные нарушения, по нашему мнению, играют определенную роль в развитии острой сократительной недостаточности миокарда при механическом повреждении сердца.

Ключевые слова: ушиб сердца, эксперимент, электронная микроскопия, кардиомиоцит, эндотелиоцит.

Травматизм и его последствия остаются актуальной проблемой в современной медицине. К одним из самых тяжелых видов травмы относятся открытые и закрытые повреждения грудной клетки, которые сопровождаются высокой летальностью. Наиболее тяжелыми при травме грудной клетки являются повреждения сердца, которые чаще образуются при дорожно-транспортных происшествиях, падениях с большой высоты и ударах тупыми твердыми предметами по передней поверхности грудной клетки в проекции расположения сердца [1–3]. Закрытая травма груди с ушибом сердца сопровождается нарушениями ритма сердечной деятельности с последующим

развитием острой сердечной недостаточности [5]. Исследования по морфологической диагностике механического повреждения миокарда продолжают оставаться немногочисленными, большая часть их выполнена на светооптическом уровне [4, 6–9]. Уточнение механизмов развития острой сократительной недостаточности миокарда позволит понять основы танатогенеза при травме сердца. Учитывая вышеизложенное, целью исследования явилась оценка ультраструктурных характеристик изменений кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при механическом повреждении сердца в виде его ушиба, так как именно электронно-микро-

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

Порвин А.Н. – ассистент кафедры судебной медицины, e-mail: sme@sibsme.ru

Кошляк Д.А. – к.м.н., ассистент кафедры судебной медицины, e-mail: sme.ngmu@mail.ru

Янковский В.Э. – д.м.н., проф. кафедры судебной медицины и права с курсом ФПК и ППВ, e-mail: yankovsckiy-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

скопическое исследование в значительной степени дополняет и расширяет возможности оценки патоморфологических изменений, полученных с помощью световой микроскопии. Проведено морфологическое исследование митохондрий, рибосом, саркоплазматического ретикулула, лизосом и гликогена кардиомиоцитов желудочков, а также митохондрий, рибосом, люминальных, свободных (цитоплазматических) и базальных микропиноцитозных везикул эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда желудочков при механическом повреждении сердца различной степени тяжести в эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи, с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», мы осуществили экспериментальное моделирование механического повреждения сердца на 48 лабораторных животных – белых крысах-самцах породы Вистар, выращенных в стандартных условиях вивария на стандартном пищевом рационе, массой 180–200 г. Эксперимент проведен под общей анестезией, обезболивание обеспечивалось диэтиловым эфиром. Непосредственно перед экспериментом животных под легким эфирным наркозом фиксировали на специальном стенде в положении на спине и с помощью игольчатых электродов электрофизиологического комплекса LabLinc model V75-25A (Coulbourn instruments, США), которые накладывались в стандартных отведениях, регистрировали электрокардиограммы с последующей обработкой полученной информации с помощью компьютерной программы LabVIEW 5.1.

Механическое повреждение сердца воспроизводилось путем нанесения ударного травматического воздействия грузом массой 50 г при ускорении свободного падения с высоты 30 см и площади соударяющей поверхности 2 см² в точку максимального проявления сердечной пульсации на передней поверхности грудной клетки. При помощи электрокардиографического контроля животные были разделены на две группы по степеням тяжести механического повреждения сердца. В группу с механическим повреждением сердца средней степени тяжести вошло 20 животных. У них электрокардиографические проявления механического повреждения складывались из одиночных и групповых желудочковых экстрасистол и синусовой брадикардии с по-

степенным возвращением к нормальному ритму. После установления нормального сердечного ритма животных декапитировали. Группа с механическим повреждением сердца тяжелой степени также состояла из 20 животных, у которых через 15–20 мин от начала эксперимента, после вышеуказанных нарушений ритма сердца, наступала фибрилляция желудочков, переходящая в астилию, после чего животных декапитировали. В качестве контрольной группы использовали 8 крыс, которых в состоянии глубокой анестезии декапитировали. У погибших животных производилось быстрое вскрытие грудной клетки с последующим отсечением сердца и забором кусочков миокарда правого и левого желудочков для исследования.

Забранные для исследования кусочки миокарда тщательно промывали охлажденным 0,9%-м раствором натрия хлорида и фиксировали в смеси 1%-го раствора параформа и 1%-го раствора глутарового альдегида, затем дважды по 5 мин промывали в дистиллированной воде. Далее кусочки миокарда фиксировали в смеси 1%-го раствора глутарового альдегида и 1%-го раствора параформа на 0,04–0,05М фосфатном буфере в течение 1 суток, после чего отмывали в двух порциях дистиллированной воды по 5 минут и дополнительно фиксировали в 4%-м растворе четырехоксида осмия в течение 4 ч. Затем проводили последовательное обезвоживание образцов миокарда, при котором вода замещалась спиртами «восходящей батареи»: 30, 50, 70 и 100 %. После этого спирт замещали ацетоном в смеси по 50 % ацетона и спирта, затем в 100%-м ацетоне. Высушивание достигалось замещением ацетона газообразной углекислотой в оригинальной установке, использующей принцип замещения в критической точке перехода при давлении углекислоты 60 атмосфер и температуре 30 °С. Подготовленные образцы монтировали на латунные блоки с использованием электропроводного клея (эпона), покрывали в вакууме углеродом в течение 1 ч с последующим нанесением золота.

Работа проводилась с соблюдением стандартных условий осуществления каждого из этапов. На первом этапе для ориентировки в изучаемом объекте изготавливали полутонкие срезы толщиной 2–3 мкм, окрашивали толудиновым синим и рассматривали с помощью светового микроскопа для определения области, которая должна быть изучена на ультрамикроскопическом уровне, чтобы в дальнейшем с этого участка прицельно приготовить ультратонкие срезы. Миокард первоначально исследовали на малом увеличении – ×100 (10 × 10), а затем при увеличении × 400 (10 × 40).

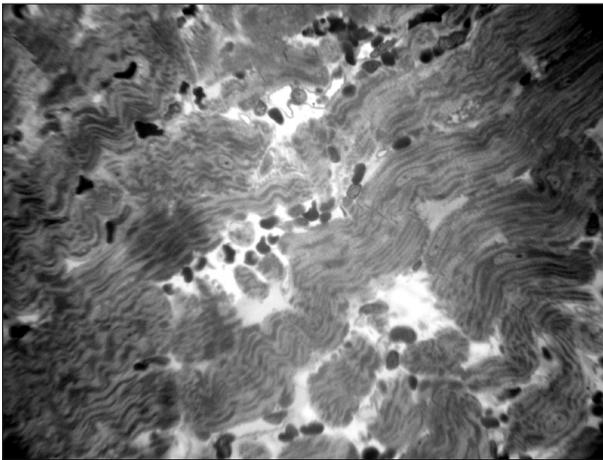


Рис. 1. Неравномерно окрашенные и волнообразно измененные мышечные волокна при ушибе сердца тяжелой степени (окраска толуидиновым синим, увеличение $\times 400$)

При световой микроскопии препаратов миокарда наблюдалось неравномерное окрашивание мышцы сердца: часть мышечных волокон, а иногда отдельные их части, выглядели более интенсивно окрашенными. Мышечные волокна с интенсивной окраской выглядели набухшими и гомогенизированными, характерная поперечная исчерченность едва определялась или не определялась вообще. Были выявлены группы волнообразно измененных, извитых сердечных мышечных волокон (рис. 1). Отмечалось неравномерно выраженное кровенаполнение артериол: часть их находилась в дистоничном состоянии, у других имелись явления спазма. Наблюдалось паретическое расширение и полнокровие венул и кровеносных капилляров, их просветы были заполнены конгломератами эритроцитов, агрегированных по типу «монетных столбиков». По вышеуказанным изменениям отобраны участки миокарда для углубленного изучения внутриклеточных нарушений, из этих областей миокарда были специально приготовлены ультратонкие срезы.

После отбора необходимых для дальнейшего исследования участков полутонких срезов миокарда получали ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм на ультратоме LKB-8800 (LKB, Швеция), которые контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (JEM 1010, Japan Electronic Materials, Япония) изучена ультраструктурная организация кардиомиоцитов, а также эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда правого и левого желудочка сердца животных описанных выше групп.

На электронограммах точечным методом охарактеризована объемная плотность (V_v) ми-

тохондрий, рибосом, саркоплазматического ретикулума, лизосом и гликогена кардиомиоцитов, а также митохондрий, рибосом, люминальных, свободных (цитоплазматических) и базальных микропиноцитозных везикул эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда желудочков. Ультраструктурный стереологический анализ образцов миокарда проводили на электронограммах срезов кардиомиоцитов и эндотелиоцитов при увеличении в 8000 раз. При этом площадь среза по микрофотографии составляла 33,28 $\mu\text{м}^2$ ($6,4 \times 5,2 \mu\text{м}$). На электронно-микроскопические изображения компьютерным способом накладывалась тестовая система в виде решетки, состоящей из пересекающихся параллельных вертикальных и горизонтальных линий, образующих множество квадратов. Тестовые точки (узлы) соответствовали местам пересечений этих линий. Расстояние между точками составляло 0,1 $\mu\text{м}$, на одной микрофотографии размещалось 3328 точек (64×52 точки). Использованный метод основан на подсчете числа узлов тестовой системы, приходящихся на исследуемую внутриклеточную структуру. По числу тестовых точек на каждой внутриклеточной структуре делалось заключение об их относительном объеме. Объемная плотность структур рассчитывалась по формуле: $V_v = P_i/P_p$, где P_i – количество точек тестовой системы, попавших на профиль исследуемой структуры; P_p – общее число точек тестовой системы, попавших на профиль среза исследуемого объекта. Для статистической оценки результатов применялась общая линейная модель, реализованная в процедуре однофакторного дисперсионного анализа с фиксированными эффектами (ANOVA) (табл. 1 и 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В кардиомиоцитах при механическом повреждении сердца средней степени тяжести обнаружены очаговые уплотнения миофибрилл из-за их пересокращения – контрактурные полосы, наблюдалась слабо выраженная фрагментация (диссоциация) отдельных мышечных волокон или их групп. При механическом повреждении сердца тяжелой степени наблюдалась резко выраженная фрагментация мышечных волокон в виде «разломов» целых групп миофибрилл. При механическом повреждении сердца отмечалась вариабельность размеров митохондрий как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения (рис. 2). Однако при количественном анализе обнаружена тенденция к возрастанию их общей объемной плотности. При механическом поврежде-

Таблица 1

Результаты морфометрического исследования объемной плотности (V_v) органелл и включений кардиомиоцитов желудочков сердца ($M \pm m$)

Органеллы и включения	Правый желудочек			Левый желудочек		
	Контрольная группа	Ушиб сердца средней степени тяжести	Ушиб сердца тяжелой степени	Контрольная группа	Ушиб сердца средней степени тяжести	Ушиб сердца тяжелой степени
Митохондрии	1687,6 ± 85,0	2024,1 ± 77,5	2833,4 ± 47,3	2530,8 ± 83,9	3289,9 ± 67,4	5262,1 ± 52,4
Рибосомы	49,3 ± 2,2	44,8 ± 2,2	34,3 ± 2,6	93,6 ± 8,3	78,0 ± 6,4	61 ± 5,7
Саркоплазматический ретикулум	17,1 ± 2,6	23,8 ± 3,2	38,9 ± 3,3	23,9 ± 1,8	35,8 ± 2,7	64,4 ± 3,6
Лизосомы	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,4	4,4 ± 1,2
Гликоген	41,9 ± 3,3	32,2 ± 4,2	21,4 ± 1,8	67,4 ± 3,6	48,2 ± 2,7	26,7 ± 2,6

Таблица 2

Результаты морфометрического исследования объемной плотности (V_v) органелл эндотелиоцитов миокарда желудочков сердца ($M \pm m$)

Органеллы и включения	Правый желудочек			Левый желудочек		
	Контрольная группа	Ушиб сердца средней степени тяжести	Ушиб сердца тяжелой степени	Контрольная группа	Ушиб сердца средней степени тяжести	Ушиб сердца тяжелой степени
Митохондрии	5,3 ± 0,3	6,7 ± 0,7	9,7 ± 0,7	7,9 ± 0,9	11,1 ± 1,9	19,9 ± 1,7
Рибосомы	13,4 ± 2,19	11,1 ± 0,8	7,9 ± 2,6	24,8 ± 4,3	16,9 ± 1,3	8,8 ± 0,6
Микропиноцитозные везикулы:						
люминальные	11,3 ± 1,1	13,5 ± 1,0	20,3 ± 4,8	14,0 ± 1,36	19,7 ± 1,7	39,3 ± 3,5
свободные	47,4 ± 2,1	53,1 ± 2,2	74,2 ± 6	66,3 ± 4,9	86,1 ± 7,2	116,1 ± 10,0
базальные	12,4 ± 0,3	13,6 ± 0,7	17,6 ± 2,13	16,1 ± 1,9	20,3 ± 1,4	27 ± 4,1

дении сердца средней степени тяжести в увеличенных, отечных митохондриях наблюдалось расширение расстояний между кристами, часто кристы были деформированными, иногда были видны их единичные разрывы. При механическом повреждении сердца тяжелой степени очаги просветления из-за отека могли занимать почти всю площадь митохондрий. Кроме того, разрывы крист были многочисленнее, встречались их частичная и полная гомогенизация. При механическом повреждении сердца отмечено значительное снижение количества рибосом в кардиомиоцитах по сравнению с кардиомиоцитами контрольной группы животных. Также наблюдалось расширение везикул саркоплазматической сети с увеличением ее объемной плотности, появление крупных вакуолей в гиалоплазме кардиомиоцитов, придающих ей «дырчатый» вид. При механическом повреждении сердца значительно чаще встречались лизосомы, практически не обнаруживаемые в кардиомиоцитах контрольной группы животных. Отмечалось резкое уменьшение, а в неко-

торых участках миокарда – полное исчезновение гранул гликогена при механическом повреждении сердца по сравнению с его содержанием в контрольной группе.

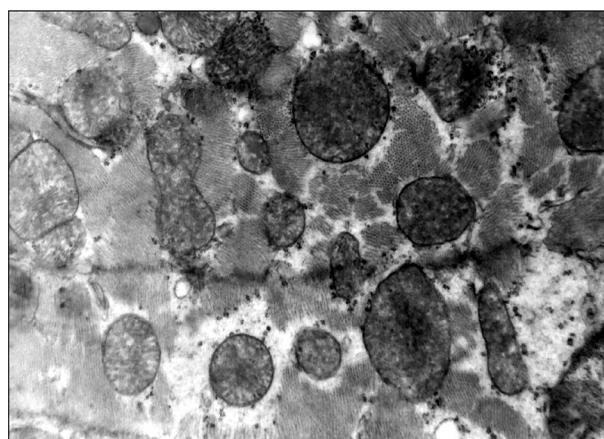


Рис. 2. Вариабельность размеров митохондрий и деформация крист при ушибе сердца средней тяжести (электронограмма, увеличение × 8000)

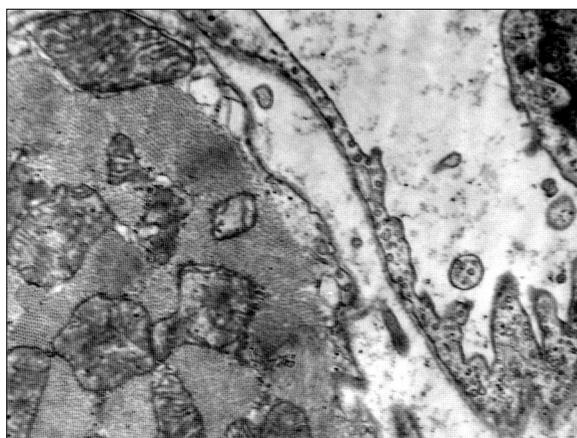


Рис. 3. Складчатость люминальной поверхности эндотелиоцита с формированием микроворсинок и явлениями клазматоза при ушибе сердца тяжелой степени (электронограмма, увеличение $\times 8000$)

В эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда при механическом повреждении сердца происходило увеличение объемных плотностей микропиноцитозных везикул по сравнению с показателями объемной плотности указанных компонентов эндотелиоцитов контрольной группы лабораторных животных, которое зависело от степени тяжести повреждения сердца. При механическом повреждении сердца более высокая объемная плотность органелл наблюдалась в эндотелиоцитах капилляров миокарда левого желудочка сердца по сравнению с эндотелиоцитами правого желудочка. В эндотелиоцитах капилляров миокарда контрольной группы животных более высокая объемная плотность микропиноцитозных везикул отмечалось у базальных поверхностей клеток. При механическом повреждении сердца средней степени тяжести обнаружена тенденция к сокращению различий объемных плотностей микропиноцитозных везикул, сконцентрированных у базальных и люминальных поверхностей эндотелиоцитов капилляров миокарда желудочков. При механическом повреждении сердца тяжелой степени наблюдалось преобладание объемных плотностей микропиноцитозных везикул, сконцентрированных у люминальных поверхностей эндотелиоцитов капилляров миокарда, над объемными плотностями микропиноцитозных везикул, расположенных у базальных поверхностей эндотелиоцитов. При механическом повреждении сердца отмечалась повышенная складчатость люминальной поверхности эндотелиоцитов, вплоть до образования микроворсинок. При механическом повреждении сердца тяжелой степени наблюдался отрыв микроворсинок эндо-

телиоцитов от тел клеток – клазматоз (рис. 3). Количественный анализ показал увеличение объемной плотности митохондрий при механическом повреждении сердца. Характер структурных изменений митохондрий эндотелиоцитов при механическом повреждении сердца был аналогичным изменениям митохондрий в кардиомиоцитах при повреждении сердца. При механическом повреждении сердца также отмечено значительное снижение количества рибосом и гранул гликогена в эндотелиоцитах по сравнению с эндотелиоцитами контрольной группы животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При механическом повреждении сердца в виде его ушиба в кардиомиоцитах желудочков увеличивается объемная плотность митохондрий, саркоплазматического ретикулума, лизосом в сочетании со снижением объемной плотности рибосом и гликогена; в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда желудочков повышается объемная плотность митохондрий и микропиноцитозных везикул, уменьшается объемная плотность рибосом.

В результате нарушений ультраструктуры митохондрий в виде их набухания, редукции, деформации и деструкции крист, вплоть до их полной гомогенизации, вызванных механическим воздействием, становится невозможным перенос электронов по электронно-транспортной цепи внутренней мембраны митохондрий, прекращается процесс окислительного фосфорилирования с образованием энергии и АТФ. Такие острые альтеративные изменения ультраструктуры митохондрий ведут к прогрессирующему энергетическому дефициту в кардиомиоцитах, богатых этими органеллами. Снижение синтеза макроэргических фосфатов неизбежно вызывает нарушение сократительной способности миофибрилл, так как мышечное сокращение требует больших затрат энергии. Нарушение целостности мембран митохондрий приводит к быстрому освобождению из органелл ионов кальция с неблагоприятными последствиями для клетки. Вышедший из митохондрий кальций активно всасывается саркоплазматическим ретикулумом, в результате чего его каналы резко расширяются вплоть до образования вакуолеподобных структур. Несмотря на то что гликолиз вносит заметно меньший вклад в общий энергетический баланс здорового миокарда, чем аэробное окисление, при механическом повреждении в результате повреждений митохондрий происходит значительное снижение его резервов. Кроме того, для про-

цессов, регулирующих уровень ионов кальция в саркоплазме клетки (а обмен кальция, как было указано, при механической травме нарушается), преимущественным источником АТФ является именно гликолиз. Существует прямая зависимость между содержанием гликогена и рибосом в гиалоплазме клеток и уровнем энергетического и пластического обмена в них. Уменьшение или исчезновение указанных компонентов цитоплазмы является одним из ранних изменений, сопровождающих нарушение метаболизма в клетках. Из-за деструктивных изменений в клетках активируются лизосомы, участвующие в системе внутриклеточного катаболизма. Активация микропиноцитозной активности эндотелия кровеносных капилляров миокарда при повреждающем механическом воздействии свидетельствует об усилении компенсаторно-приспособительных реакций в миокарде.

Выявленные альтеративные изменения кардиомиоцитов и эндотелиоцитов свидетельствуют о снижении в них энергообразующей, сократительной и белок-синтетической функции. Выраженность этих изменений зависит от степени тяжести механического повреждения миокарда. Данным нарушениям, по нашему мнению, принадлежит ведущая роль в развитии острой сократительной недостаточности миокарда при механическом повреждении сердца в результате его ушиба.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Борисенко А.П.* Поражение сердца при травматической болезни. М.: Медицина, 1990. 192 с.
2. *Гуманенко Е.К., Бояринцев В.В., Супрун Т.Ю., Ляшедько П.П.* Объективная оценка тяжести травм. СПб., 1999.
3. *Капустин А.В.* Судебно-медицинская диагностика закрытых повреждений сердца при тупой травме грудной клетки // Суд.-мед. экспертиза. 1997. (1). 3–6.
4. *Новоселов В.П., Савченко С.В., Кошляк Д.А., Воронковская М.В.* Использование морфогистохимического метода для диагностики ушиба сердца // Суд.-мед. экспертиза. 2008. (5). 16–18.
5. *Новоселов В.П., Савченко С.В., Кошляк Д.А. и др.* Оценка ультроструктурных изменений сократительного аппарата кардиомиоцитов при ушибе сердца // Суд.-мед. экспертиза. 2010. (2). 13–15.
6. *Новоселов В.П., Савченко С.В., Романова Е.А., Циммерман В.Г.* Патоморфология миокарда при ушибах сердца. Новосибирск: Наука, 2002. 167 с.
7. *Савченко С.В.* Актуальные вопросы экспертной оценки морфологии сердца // Вестн. судебной мед. 2012. 1. (3). 5–8.
8. *Соседко Ю.И.* Судебно-медицинская диагностика повреждений сердца при травме тупыми предметами // Суд.-мед. экспертиза. 2001. (6). 13–16.
9. *Elie M.-C.* Blunt cardiac injury // *Maunt. Sinai J. Med.* 2006. 73. (2). 542–552.

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE MYOCARDIUM IN MECHANICAL TRAUMA OF THE HEART IN THE EXPERIMENT

**Vladimir Pavlovich NOVOSELOV¹, Sergey Vladimirovich SAVCHENKO¹,
Aleksandr Nikolaevich PORVIN¹, Dmitriy Alekseevich KOSHLYAK¹,
Vladimir Eduardovich YANKOVSKIY², 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 *Altai State Medical University of Minzdrav of Russia
656038, Barnaul, Lenin av., 40*

Conducted a study to identify changes in the ultrastructure of cardiomyocytes and endothelial cells of blood capillaries of the myocardium of the ventricles of the heart in its mechanical damage of varying severity. Experimental modeling of the closed mechanical damage of the heart in rats of Wistar breed using original techniques. The study showed that the increase in the volume density of mitochondria, sarcoplasmic reticulum, lysosomes and decrease in the volume density of ribosomes and glycogen took place at heart damage in the form of its injury in cardiomyocytes. The increase in the volume density of mitochondria and micropinocytosis vesicles and decrease in the volume density of ribosomes have been observed in endothelial cells of the myocardium. The severity of these changes depends on the severity of mechanical damage of the myocardium. These disorders, in our opinion, play the determined role in the development of acute contractile failure of the myocardium in case of heart mechanical damage.

Key words: cardiac contusion, experiment, electron microscopy, cardiomyocyte, endothelial cell.

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*

Porvin A.N. – assistant of the department of forensic medicine, e-mail: sme.ngmu@mail.ru

*Koshlyak D.A. – candidate of medical sciences, assistant of the department of forensic medicine,
e-mail: sme.ngmu@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, of the department of hospital and pediatric surgery, e-mail: randorier@mail.ru

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПЕРИОДИЗАЦИИ РОСТА ПОЗВОНОЧНИКА

Алла Михайловна ЗАЙДМАН, Анастасия Викторовна КОРЕЛЬ,
Елена Леонидовна СТРОКОВА

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

Цель исследования – изучение морфогенетических критериев периодизации роста позвоночника в онтогенезе. Объект исследования – тела позвонков 50 мини-поросят в постнатальном онтогенезе (новорожденных, 2-недельных, 1-, 3- и 6-месячного возраста). Установлено, что процесс роста тел позвонков происходит в два основных этапа. 1. Ранний остеогенез от новорожденного до 1-месячного возраста – период интенсивной пролиферации и дифференцировки хондробластов по всему периметру тела позвонка за счет круговой зоны роста. В этот период метаболизм хрящевого тела позвонка осуществляется сосудистым путем, морфогенез тела позвонка – за счет хондрогематического барьера, регулирующего процесс остеогенеза и стимулирующего процессы пролиферации и дифференцировки. 2. В сформированном теле позвонка происходит линейный рост, который характеризуется периодизацией, дифференцировкой и остеогенезом в пластинке роста тела позвонка.

Ключевые слова: периодизация роста, хондробласт, пластинка роста, протеогликаны, хондроитинсульфаты.

Процесс роста – продолженный морфогенез в постнатальном периоде. Этапы морфогенеза, регуляция тонких механизмов роста исследованы преимущественно для длинных трубчатых костей [5–7]. Регуляция роста и структурные преобразования в пластинках роста тел позвонков представлены недостаточно [3, 4, 8]. Остаются не исследованными генетическая регуляция периодизации роста, структурные изменения хондробластов в процессе дифференцировки, пролиферации и остеогенеза. Между тем такие данные могут быть основой для трактовки патологий позвоночника, патогенез которых основан на нарушении роста.

Цель исследования – изучение морфогенетических критериев периодизации роста позвоночника в онтогенезе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили тела позвонков 50 мини-поросят в постнатальном онтогенезе (новорожденных, 2-недельных, 1-, 3- и 6-месячного возраста). Ткани фиксировали в 10%-м растворе формалина, костную ткань подвергали декальцинации в холодном трилоне «Б»

и парафиновой проводке. Препараты окрашивали традиционными методами: гематоксилином и эозином по Ван Гизону; гистохимическими методами: толуидиновым синим при разных значениях pH, альциановой синью по Хейлу и Шиффу. Ко всем реакциям ставили соответствующие контроли. Ультроструктурные исследования проводили после фиксации в глутаральдегиде и до фиксации в осмии. Препараты после проводки по спиртам заливали в аралдит. Готовили полутонкие и тонкие срезы на ультратоме LKB (Швеция), просматривали и фотографировали на электронном микроскопе «Hitachi-100» (Япония). Исследования размеров зон пластинок проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином при увеличении $\times 100$. Границы зон определяли по степени дифференцировки хондробластов. Площади зон пластинок роста исследовали методом морфометрического анализа при помощи программы Axio Vision Le Rel. 4.3. фирмы Carl Zeiss и «Morpho Images» (Германия). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи пакета программ подсчета коэффициентов формы клеток и ядер фирмы «Микромед».

Зайдман А.М. – д.м.н., проф., заслуженный деятель науки РФ, руководитель лаборатории патоморфологии и теоретических исследований в вертебродологии, e-mail: AZaidman@niito.ru

Корель А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии и теоретических исследований в вертебродологии, e-mail: AKorel@niito.ru

Строчкова Е.Л. – научный сотрудник лаборатории патоморфологии и теоретических исследований в вертебродологии, e-mail: EZavyalova@niito.ru

Для исследования уровня экспрессии генов хрящевую ткань отмывали в физиологическом растворе, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1–2 мм², затем помещали в 1,5%-й раствор коллагеназы в силиконизированной посуде и инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 22–24 ч. Полученную суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр для удаления кусочков ткани и осаждали клетки центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об/мин. Осажденные клетки идентифицировали и определяли общее их количество в камере Горяева.

РНК выделяли из клеток, полученных после центрифугирования, тризольным методом (TRI reagent, Sigma). Выделенную РНК обрабатывали RNase-free DNase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. кДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием фермента

M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США) в присутствии Oligo (dT)15 праймера (БИОССЕТ, Россия). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции без фермента использовали в качестве отрицательного контроля.

Аmplификацию фрагментов исследуемых генов проводили методом ПЦР на амплификаторе TRIO-Thermoblock (Biometra, Германия). В качестве контрольного использовался ген актина. ПЦР была выполнена с использованием *Taq*-полимеразы и ген-специфичных праймеров (табл. 1) при следующих условиях: 3 мин при 95 °С и 30 циклов: 30 при 95 °С, 30 при 58–60 °С и 30 при 72 °С.

Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в буфере ТАЕ (0,04 М Tris-HCl, 0,05 М EDTA pH 8,0) с содержанием 1 мкг/мл бромистого этидия. Для нанесения на

Таблица 1

Подбор условий для проведения ПЦР

Название гена	Название праймера	Последовательность праймера	Концентрация MgCl ₂ , мМ	Температура отжига, °С	Размер целевого фрагмента, п. о.
Актин	Actin f	5'-GCCGAGATCTCACCGACTAC-3'	3	59	360
	Actin r	5'-CCCCAGAGAGGACGTTGTTA-3			
Агрекан	ACAN1 f	5'-GAAGCAGCAGTCACACCTGA-3'	3	59	505
	ACAN1 r	5'-GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC-3'			
Люмикан	LUM f	5'-AGATCTCAAGGGTCCCCAAC-3'	3	59	357
	LUM r	5'-GCAGCTGGTTGTAGGAGAGG-3'			
Pax1	Pax1 f м	5'-ACGTGGTCAAGCACATCCGGGACT-3'	4	58	508
	Pax1 r м	5'-AAGGCGGGTTTCTCGAGCCCAT-3'			
SOX9	SOX9 f	5'-ACGCGGAGCTCAGCAAGACTCTG-3'	4	60	370
	SOX9 r	5'-TCTCGCTTCAGGTCAGCCTTGCC-3'			
Pax9	Pax9 f	5'-ATCAGCCGCATCCTGCGCAACAA-3'	4	58	596
	Pax9 r	5'-AGCGACGCGGGAATGTCACAGTTG-3'			
COL1A1	COL1A1 f	5'-TGCTCCTCTTAGCGGCCACCG-3'	4	58	280
	COL1A1 r	5'-ACCTCGCCTTCGGGGCAGAC-3'			
COL2A1	COL2A1 f	5'-CCCCGGAACTCCTGGCACGG-3'	4	58	365
	COL2A1 r	5'-CGTCAGCACCGGGAGGACCA-3'			
COL10A1	COL10A1 f	5'-AAGCGGTCCCACCCGAAGGC-3'	4	58	415
	COL10A1 r	5'-AGCCCGTTCGACCCAGCGTT-3'			
GHR	GHR f	5'-TGGGGCAAAGGATGACGACTCCG-3'	4	58	384
	GHR r	5'-TGGCCCGGGAAAGGACCAC-3'			
HAPLN	HAPLN1 f	5'-GGCTGGACTGGTGCAACGCT-3'	4	58	376
	HAPLN1 r	5'-CTGCAGCGCCTTCTTGGCCT-3'			
MMP9	MMP9 f	5'-GACGGCCGCTCAGACGGCTA-3'	4	58	343
	MMP9 r	5'-TGAGCGCCTCTGGCACGGTT-3'			
TGFB1	TGFB1 f	5'-TTCACGGCATGAACCGGCCC-3'	4	58	385
	TGFB1 r	5'-TGCTCCACCTTGGGCTTGCG-3'			
IHH	IHH f	5'-ACGTGCATGTCTCCGTCAAGTCCG-3'	3	59	314
	IHH r	5'-GCGGGCAGCTGGTTCTGTGTGATT-3'			

гель раствор ДНК смешивали с 50%-м глицерином, содержащим 0,1 % бромфенолового синего, 0,1 % ксиленцианола, в соотношении 1:10. Сканирование геля проводили в УФ-свете с помощью видеосистемы «DNA Analyzer» (Москва).

Исследовали гены, участвующие в процессе регуляции роста позвоночника (GHR, TGFB1), регулирующие процесс хондрогенной дифференцировки (SOX9, Pax 1, Pax 9, INH) и определяющие структурно-функциональные особенности матрикса хряща (ACAN 1, LUM, COL1A 1, COL2A 1, COL10A 1, HAPLN, MMP 9).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В раннем онтогенезе (новорожденный поросенок) процесс роста тел позвонков осуществляется за счет радиально расположенной зоны роста, состоящей из поверхностной зоны, зоны изогенных групп, зоны колонковых структур и зоны гипертрофических клеток (рис. 1).

В цитоплазме клеток и матриксе определяют низкополимерные хондроитинсульфаты, гиалуроновая кислота. Интенсивность реакций на хондроитинсульфаты возрастает от малодифференцированных клеток к гипертрофическим.

К межпозвонковому диску прилежит узкая поверхностная зона (табл. 2) – зона малодифференцированных расположенных параллельно друг другу клеток. В центре клетки располагаются овальной формы ядро и узкий ободок цитоплазмы. В гомогенном межклеточном матриксе идентифицируются низкополимерные хондроитинсульфаты и гиалуроновая кислота.

Ультраструктурно выявляется рибосомальный аппарат, представленный преимущественно свободными рибосомами и редкими полисомами. Комплекс Гольджи (КГ) единичен и располагается приядерно. Округлые митохондрии редкие, с хорошо выраженными кристами, представлены диффузно в цитоплазме.

Зона изогенных групп (см. табл. 2): хондробласты с округлым ядром с 1–2 ядрышками и базофильной цитоплазмой, в которой определяются

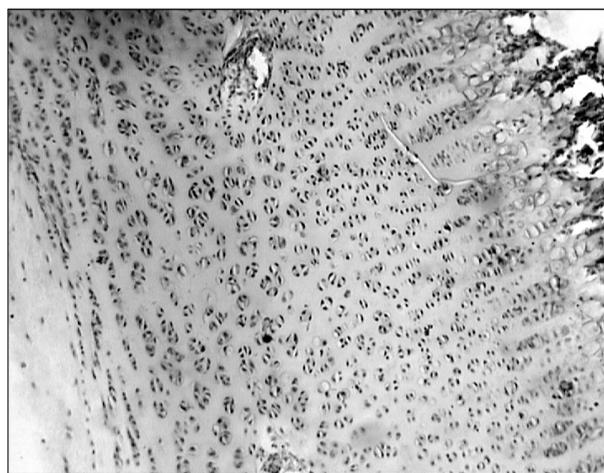


Рис. 1. Новорожденный поросенок. Круговая зона роста тела позвонка. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

мелкие гранулы гликогена и сульфатированные гликозаминогликаны, располагаются группами по 2–4 клетки, встречаются митотические пластинки. Во внеклеточном пространстве визуализируются кровеносные сосуды, окруженные интенсивно базофильной и альциан-позитивной «муфтой» (хондрогематический барьер), состоящей из протеогликанов. Ультраструктурно хондробласты относятся к дифференцированным клеткам с преимущественно приядерной локализацией КГ, везикулярный аппарат которого представлен в виде немногочисленных вакуолей. Митохондрии редкие. Выявляются свободные рибосомы. Эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами.

Зона колонковых структур представлена четкими стопками клеток, между которыми выявляются узкие прослойки слабо альциан- и Хейл-позитивного межклеточного матрикса. Ядро локализуется в центре клетки, содержит диспергированный хроматин. Цитоплазма этих клеток занимает значительный объем. Гладкий эндоплазматический ретикулум представлен широкой сетью расширенных цистерн. КГ хорошо развит и располагается по всему объему цитоплазмы.

Таблица 2

Площадь, занимаемая слоями зоны роста тела позвонка, в возрастном аспекте

Зона роста	Новорожденный	2 нед.	1 мес.	3 мес.	6 мес.
Поверхностная зона	520 ± 17	379 ± 18*	357 ± 16	265 ± 8	258 ± 15
Изогенная группа	2634 ± 36	1859 ± 15	1030 ± 120#	798 ± 37#	42 ± 9#
Колонковая структура	529 ± 14	934 ± 23*	828 ± 37	760 ± 31	5630 ± 16#
Гипертрофия клеток	616 ± 34	579 ± 15#	644 ± 26	340 ± 14#	488 ± 17#

Примечание. Значения приведены в квадратных микрометрах, умноженных на 10^2 . Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от соответствующих показателей: * – новорожденных поросят, # – предыдущего срока наблюдения.

Качественные результаты ПЦР исследуемых генов

Срок наблюдения	Ген домашнего хозяйства	Гены, определяющие структурно-функциональные особенности матрикса хряща							Гены, регулирующие процесс хондрогенной дифференцировки				Гены, участвующие в процессе регуляции роста позвоночника	
	Актин	ACAN	LUM	COL1A1	COL2A1	COL10A1	HAPLN1	ММР9	ИНН	Pax1	Pax9	SOX9	GHR	TGFB1
Новорожденный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 нед.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1 мес.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3 мес.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 мес.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Митохондрии крупные, овальной формы, с просветленным матриксом. В гиалоплазме выявляются многочисленные скопления гранул гликогена и липиды.

Слой гипертрофических клеток (см. табл. 2): гипертрофические хондроциты делятся на поверхностные (высокодифференцированные клетки), а также прилежащие к зоне остеогенеза (крупные клетки со светлой цитоплазмой и мелким и/или отсутствующим ядром). Высокодифференцированные хондроциты – это клетки с базофильными округлыми ядрами и интенсивно Хейл-позитивной цитоплазмой, околочлеточный матрикс выполнен сульфатированными гликозаминогликанами. В клетках, прилежащих к зоне остеогенеза, видны фрагментированные ядра, в большинстве клеток ядро отсутствует. В матриксе активно внедряются кровеносные сосуды, вокруг которых активируется процесс остеогенеза. В этот период экспрессируются гены – маркеры дифференцировки хондроцитов: Pax1, Pax9, Sox9, ИНН, а также гены основных компонентов матрикса: агрекан, линк-белок (HAPLN), гены коллагенов I, II и X типов (табл. 3).

В возрасте 14 дней рост тела позвонка осуществляется за счет хрящевой ткани остатка круговой зоны роста, в которой сохраняется зональность в зависимости от степени дифференцировки хондробластов (рис. 2).

Поверхностная зона прилежит к формирующемуся межпозвоночному диску. Ее размер уменьшился по сравнению с предыдущим периодом (см. табл. 2), но структура не изменилась.

Структурно: в базофильном матриксе располагаются единичные малодифференцированные вытянутые хондробласты с базофильным ядром и базофильной цитоплазмой, в которой выявляются гранулы гликогена, хондроитинсульфаты АС.

Ультраструктура усложнилась по сравнению с предыдущим сроком наблюдения: в цитоплазме выявляются скопления свободных рибосом и полисомы. Гладкий эндоплазматический ретикулум слабо развит, КГ с расширенными цистернами расположен приядерно и диффузно, увеличилось количество везикул, митохондрии единичные, округлые с электронно-плотным матриксом.

Хондробласты зоны изогенных групп расположены группами по 2–4 клетки в базофильном межклеточном матриксе, в котором интенсивны реакции на сульфатированные гликозаминогликаны. Наблюдается резкое снижение интенсивности реакции на протеогликаны вокруг хондрогематического барьера и внедрение сосудов в матрикс хряща. Вокруг сосудов сформирована костная ткань – область будущего эпифиза.

Площадь, занимаемая колонковыми структурами и матриксом, наибольшая по отношению

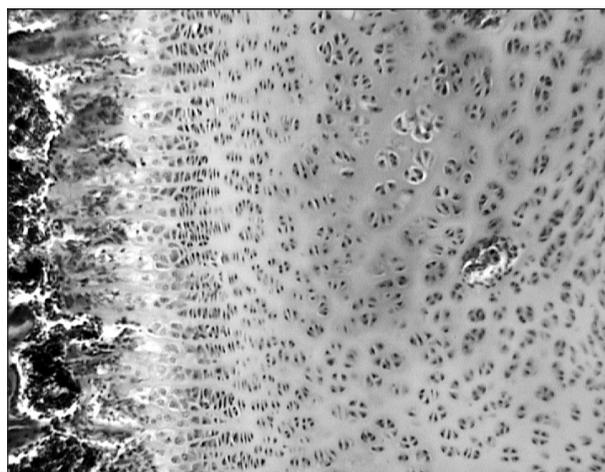


Рис. 2. Зона роста тела позвонка. 2-недельный по-росенок. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 100

к другим зонам (см. табл. 2). Наряду с синтезом хондроитинсульфатов АС в матриксе выявляется кератансульфат, что свидетельствует об усложнении структуры матрикса. Ультраструктура клеток усложняется. Эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами широко распространена по всей цитоплазме, рибосомы встречаются как в свободном виде, так и прикрепленные к эндоплазматической сети. КГ располагается диффузно, многочисленные вакуоли расположены примембранно, митохондрии с хорошо выраженными кристами многочисленны. В этот период наблюдается экспрессия всех исследуемых генов, сопряженных с синтезом белков и протеогликанов, экспрессия гена ИНН не регистрируется (см. табл. 3), что свидетельствует о некотором замедлении стадии дифференцировки хондробластов.

В возрасте 1 мес. сформирована линейная пластинка роста тела позвонка (рис. 3). Матрикс и хондроциты по-прежнему располагаются в определенной зональности практически подобно предыдущему возрасту. Площадь гипертрофического слоя увеличена по отношению к предыдущим срокам (см. табл. 1). В матриксе и цитоплазме клеток выявляются высокополимерные сульфатированные гликозаминогликаны, наиболее интенсивно – вокруг клеточных групп и в межтерриториальном матриксе.

Особенно интенсивны реакции на высокополимерные протеогликаны в цитоплазме предгипертрофических клеток. На ультраструктурном уровне увеличивается количество элементов КГ и вакуолей, которые рассредоточены по всей цитоплазме, особенно примембранно, что свидетельствует о синтетической активности клеток и экстраклеточном транспорте протеогликанов.

Наблюдаются широкие поля эндоплазматической сети с расширенными цистернами и многочисленные митохондрии с хорошо контурирующимися кристами. Все исследуемые гены, за исключением ИНН, экспрессируются, что свидетельствует об интенсивности процесса роста, а также функциональной напряженности клеток этого ряда, но некотором снижении скорости дифференцировки хондробластов (отсутствие экспрессии ИНН) (см. табл. 3). Активность пролиферации клеток подтверждается широкой зоной колонковых структур.

В возрасте 3 мес. сформированы пластинка роста, замыкательная пластинка и эпифизы (рис. 4). Матрикс однородный, зональность по-прежнему сохранена, но в этот период наблюдается интенсификация процесса дифференцировки хондробластов. Зона изогенных групп сужена (см. табл. 2), но значительно расширена зона колонковых структур. На этом фоне активизировалась синтетическая активность клеток: реакции на высокополимерные протеогликаны интенсивны как в матриксе, так и внутри клеток. Ультраструктурно: сформирован хондрометаболический барьер, происходит переключение синтеза на коллаген II типа, что свидетельствует о процессе «зрелости» хрящевой ткани. Этот период может быть охарактеризован как период линейного роста. Зона роста «перекрывается» костной пластинкой, препятствующей инвагинации сосудов в хрящевую ткань. Все исследуемые гены экспрессируются в данном периоде (см. табл. 3).

В возрасте 6 мес. структура тела позвонка полностью сформирована (рис. 5). Узкая линейная пластинка роста расположена между эпифизом и телом позвонка. Ее апикальная поверхность отделена от эпифиза узкой поверхностной зоной,

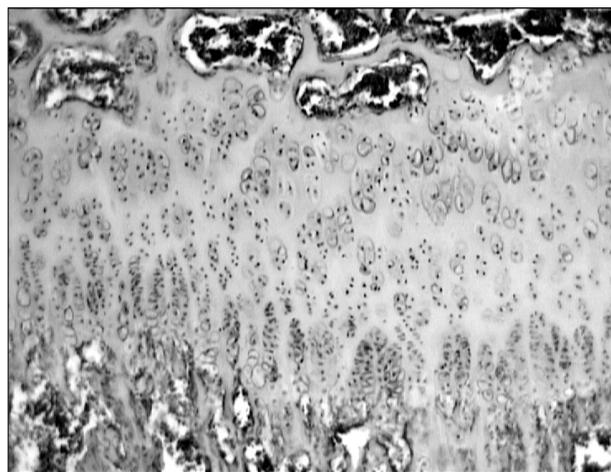


Рис. 3. Пластинка роста тела позвонка месячного поросенка. Окраска ализариновым синим. Увеличение $\times 100$

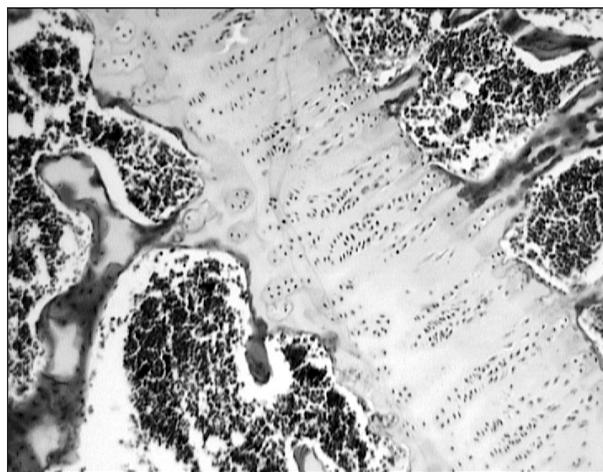


Рис. 4. Сформированные пластинка роста и эпифизы 3-месячного поросенка. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

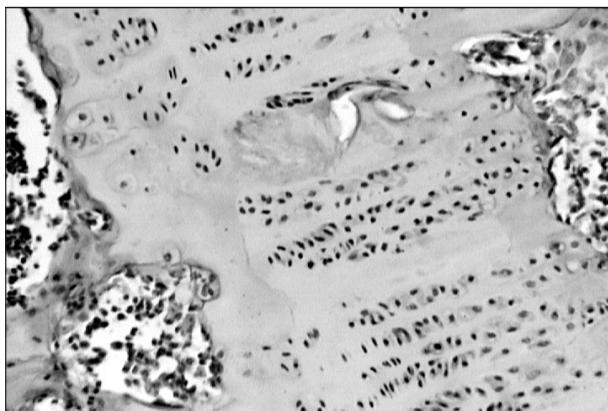


Рис. 5. «Разрывы матрикса». 6-месячный поросенок. Окраска альциановым синим. Увеличение $\times 200$

в матриксе которой интенсифицированы реакции на высокополимерные протеогликаны – хондроитинсульфаты (Хейл-реакция). Вероятно, эта зона выполняет барьерные функции, так как состоит из продольно расположенных тонких коллагеновых волокон, связанных с протеогликанами.

Зона изогенных групп практически отсутствует (см. табл. 2), только редкие изогенные группы клеток по 2–4 в лакуне располагаются среди базофильного матрикса. Вся площадь пластинки роста практически заполнена колонковыми структурами, составляющие их клетки находятся на разной стадии дифференцировки. Цитоплазма клеток и межклеточный матрикс выполнены высокополимерными протеогликанами, особенно интенсивны реакции на гликозаминогликаны вокруг клеток.

Зона остеогенеза широкая, внедряющиеся сосуды лизируют матрикс между гипертрофическими клетками. Обращают на себя внимание зоны «разрыва матрикса» между гипертрофическими и колонковыми клетками. Эти участки морфологически определяются в виде зон сухого некроза и, по мнению Т.И. Виноградовой [1], являются следствием «разрыва» матрикса в результате интенсивного деления хондроцитов, знаменующего интенсификацию роста. На основании предыдущих исследований [3] надо полагать, что разрывы матрикса в хрящевой пластинке роста возникают как следствие отека в связи с усложнением структурной композиции тела позвонка – формированием эпифиза и нарушением единой транспортной системы метаболитов, особенно лимфодренажа.

Ультраструктура клеток характеризует стадию дифференцировки клеток: в основном это высокодифференцированные клетки с крупным ядром, диспергированным хроматином, 1–2 ядрышками и с обогащенной органеллами цитоплазмой. КГ с хорошо выраженными вакуолями,

рассредоточенными по всей цитоплазме. Большое количество вакуолей расположено примембранно. Эндоплазматическая сеть широкая, с расширенными цистернами. Митохондрии с хорошо выраженными многочисленными кристами. В измененных хондроцитах ядро пикнотичное или отсутствует, органеллы редуцированы. Многие клетки находятся в апоптозе. Все исследуемые гены, за исключением *Rax1* и *Rax9*, в этом периоде экспрессируются, что свидетельствует о структурной «зрелости» пластинки роста тела позвонка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс роста тел позвонков происходит в два основных этапа. Первый этап – это ранний остеогенез от новорожденного до месячного возраста, который можно охарактеризовать как «взрывной» рост: период интенсивной пролиферации и дифференцировки хондробластов по всему периметру тела позвонка за счет круговой зоны. В этот период метаболизм хрящевого тела позвонка осуществляется сосудистым путем, а морфогенез – за счет хондрогематического барьера [2], регулирующего процессы остеогенеза, пролиферации и дифференцировки. В сформированном теле позвонка осуществляется линейный рост, который характеризуется периодизацией, дифференцировки и остеогенеза в пластинке роста тела позвонка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградова Т.П. Биологические особенности хрящевой ткани и их значение // Арх. патологии. 1966. (8). 3–9.
2. Зайдман А.М. Идиопатический сколиоз. М.: Наука, 1994.
3. Зайдман А.М., Корель А.В. Структурно-функциональные особенности пластинки роста тела позвонка человека в критические периоды роста // Хирургия позвоночника. 2004. (1). 113–120.
4. Зайдман А.М., Строчкова Е.Л., Новиков В.В. и др. Экспрессия генов в хондроцитах пластинки роста у пациентов с идиопатическим сколиозом // Хирургия позвоночника. 2014. (4). 88–98.
5. Burdan F., Szumilo J., Korobowicz A. et al. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate // Folia Histochem. Cytobiol. 2009. 47. (1). 5–16.
6. Wuelling M., Vortkamp A. Chondrocyte proliferation and differentiation // Endocr. Dev. 2011. 21. 1–11.
7. LuValle P., Vortkamp A. Cell cycle control in growth plate chondrocytes // Front. Biosci. 2000. 5. D493–D503.
8. Lui J., Baron J. Mechanisms limiting body growth in mammals // Endocr. Rev. 2011. 32. (3). 422–440.

MORPHOLOGICAL CRITERIA FOR PERIODIZATION OF SPINE DEVELOPMENT

Alla Mikhaylovna ZAIDMAN, Anastasiya Viktorovna KOREL, Elena Leonidovna STROKOVA

*Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

The objective of the research was to study morphogenetic criteria for periodization of spine development in ontogenesis. The subject of the study was vertebral bodies of 50 mini pigs in the postnatal period (newborn, two-week-old, one-month-old, three-month-old, and six-month-old piglets). It was found that vertebral bodies develop in two stages. Stage 1 involves early osteogenesis from birth till one month of age, which is a period of intense chondroblast proliferation and differentiation around the vertebral body perimeter due to a circular growth zone. During this period, vertebral body cartilage metabolism is mediated by vessels. Growth control is associated with the blood-cartilage barrier restraining osteogenesis, stimulating cell proliferation and differentiation by maintaining the homeostasis of cells and the matrix. Stage 2 involves linear growth, which is characterized by decreased proliferation and intensified synthetic processes that are followed by differentiation of chondroblasts into chondrocytes. This period of development is associated with the formed cartilage growth plate contributing to the longitudinal development of the vertebral body.

Key words: periodization of development, chondroblast, growth plate, proteoglycans, chondroitin sulfates.

Zaidman A.M. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of pathomorphology and theoretical research in vertebrology, honored scientist of the RF, e-mail: AZaidman@niito.ru

Korel A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of pathomorphology and theoretical research in vertebrology, e-mail: AKorel@niito.ru

Strokova E.L. – researcher of laboratory of pathomorphology and theoretical research in vertebrology, e-mail: EZavyalova@niito.ru

УЧАСТИЕ ГЛУТАТИОНА И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Евгения Викторовна ШАХРИСТОВА¹, Елена Алексеевна СТЕПОВАЯ¹,
Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА^{2,3}, Ольга Леонидовна НОСАРЕВА¹,
Роман Игоревич ЧИЛЬЧИГАШЕВ¹, Вячеслав Викторович НОВИЦКИЙ¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Сибирский федеральный университет
660041, г. Красноярск, просп. Свободный, 79

³ Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Цель исследования – установление роли глутатиона и окислительной модификации белков в реализации апоптоза клеток эпителия молочной железы при индуцированном окислительном стрессе. **Материал и методы.** Объектом исследования выбрана культура клеток эпителия молочной железы человека (HBL-100). Окислительный стресс в клетках индуцировали 0,3 мМ пероксида водорода. Протектор SH-групп белков, 1,4-дитиоэритритол, использовали для модуляции редокс-статуса клеточной линии HBL-100 в условиях активации свободнорадикального окисления. Оценивали содержание внутриклеточных активных форм кислорода, карбонильных производных белков, восстановленного, окисленного глутатиона и интенсивность апоптотической гибели клеток в условиях развития окислительного стресса и культивирования клеток линии HBL-100 в присутствии 1,4-дитиоэритритола. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что 1,4-дитиоэритритол оказывает протекторное влияние на клеточные белки, препятствуя их необратимому карбонилированию посредством восстановления редокс-потенциала глутатиона, и снижает апоптотическую гибель при развитии окислительного стресса в клетках эпителия молочной железы.

Ключевые слова: окислительный стресс, редокс-статус клеток, карбонильные производные белков, клетки эпителия молочной железы, апоптоз.

В основе патогенеза многих заболеваний (сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, воспалительные, онкологические и др.), а также процессов адаптации и старения лежит активация свободнорадикального окисления [5]. Развитие окислительного стресса в различных типах клеток обусловлено резкой интенсификацией процессов свободнорадикального окисления и/или снижением резерва антиоксидантной

защиты, что приводит к значительному накоплению активных форм кислорода (АФК) [5, 6, 12]. Последние вызывают окислительную модификацию белковых и липидных молекул, повреждение ДНК, нарушение структуры мембран [2, 15]. АФК способны регулировать различные клеточные функции, а изменения редокс-статуса клеток при окислительном стрессе оказывают влияние на активность факторов транскрипции и

Шахристова Е.В. – к.м.н., руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: shaxristova@yandex.ru

Степовая Е.А. – д.м.н., проф. кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: tuiir@mail.ru

Рязанцева Н.В. – д.м.н., проф. кафедры биофизики, проф. кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии

Носарева О.Л. – к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, e-mail: olnosareva@yandex.ru

Чильчигашев Р.И. – студент 5-го курса медико-биологического факультета

Новицкий В.В. – д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии

экспрессию ряда генов как при адаптивной реакции клеток в экстремальных условиях, так и при развитии патологических процессов [3, 5, 7, 10]. Моделирование развития свободнорадикальных процессов в эпителиальных клетках молочной железы может быть использовано для установления роли редокс-белков и системы глутатиона в регуляции пролиферации и апоптоза клеток при развитии патологических процессов.

Цель исследования – установить роль глутатиона и окислительной модификации белков в реализации апоптоза клеток эпителия молочной железы при индуцированном окислительном стрессе с использованием протектора SH-групп 1,4-дителиоэритритола (DTE).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в культуре клеток эпителия молочной железы человека (HBL-100), полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург). Клетки линии HBL-100 культивировали адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей 90 % RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США). Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим («Seriva», США). Окислительный стресс в клетках эпителия молочной железы индуцировали добавлением пероксида водорода (H_2O_2) в конечной концентрации 0,3 мМ [8]. Для оценки участия глутатиона и окислительной модификации белков в реализации запрограммированной гибели изменяли редокс-статус клеток линии HBL-100 посредством инкубации в течение 18 ч при 37 °С и 5 % CO_2 в присутствии 1,4-дителиоэритритола («Sigma Aldrich», США), протектора SH-групп протеинов и пептидов в конечной концентрации 5 мМ [11].

Интенсивность окислительной модификации протеинов оценивали по содержанию карбонильных производных белков методом, основанным на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали спектрофотометрически [1]. При длине волны 274 нм регистрировали образование альдегидфенилгидразонов, при 363 нм – кетондинитрофенилгидразонов.

Оценку содержания АФК проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном лазерном цитометре «FaCSCanto II» («Becton

Dickinson», США), клетки предварительно инкубировали с 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом в конечной концентрации 5 мкМ («Sigma Aldrich», США) [13]. В основе метода лежит способность 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (не флуоресцирующего) проникать в цитоплазму клеток в виде ацетилового эфира, деэстерифицироваться под действием эстераз, что исключает возможность его транспорта из клеток, и приобретать способность флуоресцировать после взаимодействия с пероксидом водорода и его метаболитами.

Концентрацию общего, восстановленного (GSH), окисленного (GSSG) глутатиона и величину отношения восстановленной формы трипептида к окисленной (GSH/GSSG) определяли методом, предложенным М.Е. Anderson, в модификации I. Rahman и соавторов [14]. Принцип метода основан на способности GSH взаимодействовать с 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислотой с образованием тионитрофенольного аниона, имеющего характерный максимум поглощения при длине волны 412 нм. При этом образуется GSSG, который восстанавливается специфически глутатионредуктазой, и восстановленная форма трипептида вновь взаимодействует с 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислотой. Скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию общего глутатиона. Для определения GSSG пробы предварительно инкубировали с блокатором SH-групп – 2-винилпиридином («Wako», Япония), который необратимо связывает в пробе восстановленный глутатион, и поэтому в данном случае скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию GSSG.

Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аминокислот лизина и аргинина белковых молекул [9].

Определение количества аннексин- и пропилий йодид-положительных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченного аннексина V и пропилий йодида (PI) («eBioscience», Австрия) по протоколу фирмы-производителя. Метод основан на специфическом связывании FITC-меченного аннексина V с фосфатидилсеринем и способности пропилий йодида интеркалировать с молекулой ДНК. Количество FITC⁺/PI⁻ и FITC⁺/PI⁺-меченных клеток выражали в процентах от общего числа клеток.

Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро–Уилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,05$ вы-

числяли средневыворочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Краскала–Уоллиса для малых групп. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глутатиону принадлежит ведущая роль в защите клеток от свободнорадикального окисления благодаря наличию свободных SH-групп и способности выступать коэнзимом для ряда ферментов антиоксидантной защиты, а также участвовать в регуляции функциональной активности редокс-чувствительных белков посредством их глутатионирования [4, 6]. Индукция окислительного стресса пероксидом водорода (H_2O_2) в клетках эпителия молочной железы линии HBL-100 приводила к снижению концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и увеличению содер-

жания окисленной формы трипептида (GSSG) по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию прооксиданта (табл. 1). Снижение редокс-статуса клеток эпителия молочной железы способствовало увеличению (в 2,9 раза; $p < 0,01$) внутриклеточной продукции АФК по сравнению с клетками линии HBL-100 без воздействия (табл. 2). Нарботка АФК, способных повреждать макромолекулы, и сокращение пула GSH приводили к увеличению окислительной модификации протеинов клеток эпителия молочной железы, культивируемых с H_2O_2 (повышению концентрации карбонильных производных белков, определяемой при длинах волн 274 нм (в 4,4 раза; $p < 0,01$) и 363 нм (в 4,1 раза; $p < 0,01$) по сравнению с уровнем окислительной модификации протеинов в культуре без воздействия, см. табл. 2). Модификация первичной структуры полипептидной цепи с образованием карбонильных производных белков сопровождается нарушением конформации белковой молекулы и потерей функциональных свойств. Смещение окисли-

Таблица 1

Содержание форм глутатиона в клетках эпителия молочной железы линии HBL-100 при действии DTE в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, Me (Q_1 – Q_3)

Клетки	Общий глутатион, нмоль/мг белка	GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	GSH/GSSG, у.е.
Клетки линии HBL-100	5,84 (5,39–5,91)	5,39 (4,92–5,42)	0,49 (0,45–0,49)	11,50 (11,06–11,71)
Клетки линии HBL-100 + H_2O_2	5,11* (4,36–5,16)	4,46* (3,77–4,50)	0,65* (0,59–0,66)	6,73* (6,38–6,80)
Клетки линии HBL-100 + H_2O_2 + DTE	5,29 (5,10–5,37)	4,86# (4,79–5,07)	0,57 (0,56–0,59)	7,92# (7,52–8,01)

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые ($p < 0,01$) отличия от величин соответствующих показателей нативных клеток HBL-100 (*) и культивируемых в присутствии H_2O_2 (#).

Таблица 2

Содержание аннексин V-положительных клеток, АФК и карбонильных производных белков в клетках эпителия молочной железы линии HBL-100 при действии DTE в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, Me (Q_1 – Q_3)

Клетки	Количество аннексин V ⁺ -клеток, %	Активные формы кислорода, у. е.	Карбонильные производные белков, у.е./мг белка	
			$\lambda = 274$ нм	$\lambda = 363$ нм
Клетки линии HBL-100	15,10 (14,80–16,90)	0,53 (0,51–0,53)	1,15 (0,78–1,48)	1,85 (1,48–1,97)
Клетки линии HBL-100 + H_2O_2	32,70* (30,80–32,78)	1,52* (1,49–1,56)	5,05* (4,14–5,47)	7,50* (6,70–8,40)
Клетки линии HBL-100 + H_2O_2 + DTE	24,60# (23,60–25,90)	1,02# (0,92–1,03)	3,42# (3,38–3,43)	5,77# (5,66–5,85)

тельно-восстановительного баланса в сторону окислительных процессов и повреждение макромолекул в клетке могут приводить к запуску запрограммированной клеточной гибели. В клетках эпителия молочной железы, культивированных с H_2O_2 , нами обнаружено увеличение числа апоптотически измененных клеток (в 2,2 раза; $p < 0,01$) по сравнению с интактной культурой (см. табл. 2).

Культивирование клеток линии HBL-100 в условиях окислительного стресса в присутствии DTE приводило к снижению (в 1,5 раза; $p < 0,01$) внутриклеточной продукции АФК (см. табл. 2) и увеличению редокс-потенциала глутатиона, что выражалось в повышении концентрации GSH по сравнению с клетками, инкубированными только с H_2O_2 (см. табл. 1). Нами установлено, что при активации свободнорадикального окисления в клетках эпителия молочной железы DTE способен снижать содержание карбонильных производных белков, определяемое при длинах волн 274 и 363 нм (соответственно в 1,5 раза, $p < 0,01$, и в 1,3 раза, $p < 0,01$), по сравнению с уровнем окислительной модификации протеинов в культуре в присутствии H_2O_2 (см. табл. 2). Таким образом, DTE, защищая SH-группы белков и пептидов от повреждающего воздействия АФК, оказывает непосредственное протекторное влияние на процессы окислительной модификации протеинов, а также опосредованное через восстановление редокс-статуса клетки и, возможно, активацию процессов глутатионирования белков.

Оценка количества апоптотически измененных клеток линии HBL-100 при индуцированном окислительном стрессе в условиях их культивирования с DTE показала значимое снижение количества аннексин-положительных клеток (в 1,3 раза; $p < 0,01$) по сравнению с культурой, содержащейся в присутствии H_2O_2 (см. табл. 2). Увеличение концентрации GSH подавляет запрограммированную клеточную гибель, так как восстановленная форма глутатиона регулирует редокс-гомеостаз клетки и функциональную активность многих протеинов, в частности транскрипционных факторов, способствующих выживанию клеток [3, 6, 10].

В результате проведенного исследования установлено, что редокс-статус клетки и окислительная модификация белков играют важную роль в реализации запрограммированной гибели при индуцированном окислительном стрессе, что необходимо учитывать при разработке новых терапевтических подходов для лечения заболеваний, сопровождающихся развитием свободнорадикального окисления, в частности онкологических, воспалительных сердечно-сосудистых.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда в рамках научного проекта № 15-36-01289.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб., 2000. 104 с.
2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб., 2006. 400 с.
3. Кондакова И.В., Какурина Г.В., Смирнова Л.П., Борунов Е.В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // Сиб. онкол. журн. 2005. (1). 58–61.
4. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. 2009. 55. (3). 255–277.
5. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск, 2008. 284 с.
6. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. 72. (2). 158–174.
7. Степовая Е.А., Петина Г.В., Жаворонок Т.В. и др. Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. (8). 161–165.
8. Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л. Индукция пероксидом водорода окислительного стресса *in vitro* в эпителиальных клетках молочной железы для изучения апоптоза опухолевых клеток линии MCF-7 // Сиб. науч. мед. журн. 2015. 35. (2). 5–10.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 7. (1, 2). 248–254.
10. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // Antioxid. Redox Signal. 2011. 15. (8). 2335–2381.
11. Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxyxynitrite to *Escherichia coli* // Arch. Biochem. Biophys. 1995. 316. (1). 327–333.
12. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress // Biochem. Soc. Trans. 2007. (5). 1147–1150.

13. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? // Br. J. Pharmacol. 2004. (142). 231–255.
14. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method // Nat. Protoc. 2006. 1. (6). 3159–3165.
15. Wong C.M., Bansal G., Marcocci L., Suzuki Y.J. Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling // Redox Rep. 2012. 17 (2). 90–94.

THE ROLE OF GLUTATHIONE AND PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION IN APOPTOSIS OF BREAST EPITHELIAL CELLS UNDER INDUCED OXIDATIVE STRESS

Evgenija Viktorovna SHAKHRISTOVA¹, Elena Alekseevna STEPOVAYA¹, Natal'ja Vladimirovna RYAZANTSEVA^{2,3}, Ol'ga Leonidovna NOSAREVA¹, Roman Igorevich CHIL'CHIGASHEV¹, Vyacheslav Viktorovich NOVITSKY¹

¹ Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moscovski Trakt, 2

² Siberian Federal University
660041, Krasnoyarsk, Svobodnyj av., 79

³ Krasnoyarsk State Medical University n. a. Professor V.F. Voino-Yasenetsky
660022, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznjaka str., 1

The research objective. The aim of the study was to establish the role of glutathione and proteins oxidative modifications in the breast cells apoptosis realization during cultivation with hydrogen peroxide. Material and methods. The cell culture of human breast epithelium (HBL-100) has been chosen as the objects of the research. Oxidative stress in cells was induced by hydrogen peroxide 0.3 mMole. A protector of protein SH groups, 1,4-dithioerythritol, was used to modulate redox status of HBL-100 cells under the conditions of free radical oxidation activation. The concentration of intracellular reactive oxygen species, protein carbonyl derivatives, reduced and oxidized glutathione as well as the intensity of apoptotic cell death were evaluated under the conditions of oxidative stress and HBL-100 cell culturing in the presence of 1,4-dithioerythritol. Results and discussion. It was found that 1,4-dithioerythritol has protective effect on cell proteins, preventing their irreversible carbonylation by restoring glutathione redox potential. Moreover, it reduces apoptosis of breast epithelial cells under oxidative stress.

Key words: oxidative stress, cell redox status, carbonyl derivatives of proteins, breast epithelial cell, apoptosis.

Shakhristova E.V. – candidate of medical sciences, head of the laboratory of molecular medicine, assistant professor of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: shaxristova@yandex.ru

Stepovaya E.A. – doctor of medical sciences, professor of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: muir@mail.ru

Ryazantseva N.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for biophysics, professor of the chair for biological chemistry with courses of medical, pharmaceutical and toxicological chemistry

Nosareva O.L. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for biochemistry and molecular biology with the course of clinical laboratory diagnostics, e-mail: olnosareva@yandex.ru

Chil'chigashev R.I. – student of the 5th course of medical biological faculty

Novitsky V.V. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, head of the chair for pathophysiology

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕРГОГЕННЫХ СВОЙСТВ НОВОГО СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ТОНКОДИСПЕРСНОГО СОРБЕНТА

Татьяна Викторовна ПОПОВА¹, Татьяна Генриховна ТОЛСТИКОВА²,
Андрей Юрьевич ЛЕТЯГИН¹, Любовь Никифоровна РАЧКОВСКАЯ¹

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

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

Цель работы – исследование аллергенности нового серебросодержащего тонкодисперсного сорбента на крысах популяции Wistar методом накожной аппликации и конъюнктивальной пробы. **Материал и методы.** Для исследования взята новая оригинальная субстанция, состоящая из двух компонентов: тонкодисперсный серебросодержащий сорбент и гель хитозана в соотношении 1:1. Сорбционный агент представляет собой кремнийсодержащий термоактивированный гидроксид алюминия, модифицированный серебросодержащим компонентом. Эксперимент проводили на 32 крысах-самках породы Вистар, применяя метод накожных аппликаций и конъюнктивальную пробу. **Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования аллергенности серебросодержащего сорбента методом накожных аппликаций и конъюнктивальной пробы получены отрицательные результаты. Делается заключение, что разработанный серебросодержащий сорбент при накожных аппликациях и конъюнктивальной пробе не вызывает аллергических реакций и может быть рекомендован как активный фармацевтический ингредиент для наружных лекарственных или косметических средств.

Ключевые слова: серебросодержащие сорбенты, аллергия, накожная проба, конъюнктивальная проба.

В последнее время стремительно увеличивается диапазон применения сорбционных препаратов как в области медицины (хирургия, дерматология, эфферентная терапия), так и в области косметологии (детские присыпки, пудры для лица и тела, сухие шампуни) [16]. К сорбентам, применяемым в этих сферах, сформированы четкие требования: они должны быть механически прочными, химически стойкими (инертными), обладать заданными стандартизованными гранулометрическими и текстурными параметрами, минимально травмировать биологические ткани, не оказывать токсического воздействия на органы и ткани, быть селективными в отношении определенных классов соединений, быть конкурентоспособными, иметь низкую энергоемкость в производственном цикле, а также отвечать требованиям экологической безопасности [1, 12, 13].

Перспективным материалом, отвечающим всем вышеперечисленным требованиям, представляется тонкодисперсный серебросодержащий сорбент, разработанный в НИИ клинической

и экспериментальной лимфологии совместно с ООО «Вектор-Вита». Отличительные черты разработанного препарата – сорбционная поверхность до 100 м²/г, размер частиц 40 мкм, мезо-, макропористая структура, дифильная природа поверхности, что позволяет рекомендовать его как аппликационное средство или компонент для изделий медицинского назначения [8]. Важным фактором является возможность модификации поверхности сорбционного материала [10], т.е. способность удержания на этой поверхности биологически активных веществ с дальнейшим высвобождением их при взаимодействии со средами и тканями организма. Так, разработанный серебросодержащий препарат, модификатором которого служат частицы серебра (2–5 нм), выполняет функцию детоксикации, антимикробной и вирулицидной активности – как за счет высвобождения с поверхности сорбента в окружающий объем биологической среды, так и при точечном контакте биологической среды с поверхностью [9, 14, 17, 18]. Это позволяет значительно рас-

Попова Т.В. – аспирант, e-mail: argentum.popova@mail.ru

Толстикова Т.Г. – д.б.н., проф., зав. лабораторией фармакологических исследований

Летягин А.Ю. – д.м.н., проф., ведущий научный сотрудник лаборатории лимфорегуляции, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Рачковская Л.Н. – к.х.н., зав. лабораторией лимфорегуляции

ширить возможную область применения разработанного средства.

Учитывая вышеперечисленные положительные качества нового сорбционного препарата, представляется необходимым оценить и его аллергенные свойства, так как предполагаемая сфера применения данного материала – медицина и/или косметология.

Цель работы – исследование аллергенности нового серебросодержащего тонкодисперсного сорбента на крысах популяции Wistar с помощью метода кожной аппликации и конъюнктивальной пробы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемый сорбционный образец, порошок бежевого цвета, представляет собой термоактивированный гидроксид алюминия с нанесенным на его поверхность кремнийорганическим полимером, модифицированным путем физической адсорбции 1%-м серебросодержащим раствором «Арговит-С» (Ag/ТАГА), разрешенным к использованию внутрь в качестве биологически активной добавки (ФС 42-11-94-78). Имеются также литературные данные, подтверждающие эффективность «Арговит-С» при лечении поверхностных ран [2]. В рамках исследования, ввиду нерастворимой природы сорбента, была разработана мягкая лекарственная форма (паста), состоящая из твердой грубодисперсной фазы (серебросодержащий сорбент) и основы (гель хитозана) в соотношении 1:1 [5]. Выбор биополимера в качестве мазевой основы обусловлен его биосовместимостью и нетоксичностью для живых тканей, бактериостатическим и фунгистатическим эффектами, а также противоопухолевым, ранозаживляющим действием. Обладая гидрофобными свойствами, хитозан способен взаимодействовать с белками и липидами, входящими в состав клеточных мембран, а свойства положительно заряженного поликатионита обеспечивают взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью кожи и волос. С точки зрения технологии создания пасты использованный полимер выполняет функцию структурообразователя, способного удерживать

влагу в композиции, предохраняя ее от быстрого высыхания [6, 15].

В табл. 1 представлены физико-химические характеристики разработанного образца в сравнении с наиболее близкими по составу сорбентами: СУМС-1, применявшимся в клинической практике [11], и каолином – обезвоженным порошком белого или молочно-белого цвета (белая глина), который является фармакопейным препаратом (ГОСТ 21285-75).

Согласно унифицированной методике 1979 г. измеряли: величину удельной поверхности ($S_{уд}$) методом Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ) по определению объема газа (азот) относительно мономолекулярного слоя и площади поперечного сечения молекулы адсорбированного газа с построением изотермы адсорбции азота; суммарный объем пор ($V_{\Sigma пор}$) методом ртутной порометрии (установка DigiSorb-2600 Micromeritics, США); насыпную плотность образцов в слое после их естественной усадки; рН путем периодического перемешивания в течение 50 мин навески сорбента с дистиллированной водой в соотношении 1:20 (рН-метр «рН-410», НПКФ «Аквилон», Россия), фиксируя температуру раствора; сорбционную активность в отношении метиленового голубого (маркер средномолекулярных токсинов) по методике [3] (спектрофотометр Cary 60 «Hekatech», Германия); размер частиц лазерным дифрактометрическим (оптическим) методом (SHIMADZUSALD-2101 (SALD – 2102 – WEAL: V1.20, Япония) в диапазоне размера частиц 0,4–1 мм, согласно [4].

Исследования аллергенности двухкомпонентной пасты выполняли на базе лаборатории фармакологических исследований отдела медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Эксперимент выполнен на 32 крысах-самках породы Wistar (масса тела 200–225 г) с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС). Аллергенные свойства изучали на двух моделях: с помощью метода кожных аппликаций и конъюнктивальной пробы, которые являются чувствительными тестами и позволяют выявить

Таблица 1

Физико-химические характеристики сорбентов

Образец	Содержание Ag в образце, об. %	Размер частиц, мкм	$S_{уд}^2$, м ² /г	$V_{\Sigma пор}$, см ³ /г	Насыпная плотность, г/см ³	рН	Сорбционная активность в отношении метиленового голубого, мг/г
Ag/ТАГА	0,45 ± 0,1	До 40	98	0,2	0,99–1,24	8,0 ± 0,1	11,0 ± 0,8
СУМС-1	–	400–1000	200	0,4	0,75–1	7,8 ± 0,1	16 ± 0,8
Каолин	–	До 5	8	0,2	0,7–1	8,0 ± 0,1	29,9 ± 0,8

Таблица 2

Оценочная шкала кожной реакции

Оценочная шкала (балл)	I группа	II группа
Видимой реакции нет (0)	+	+
Бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии (1)	–	–
Ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии (2)	–	–
Красная эритема по всему участку (3)	–	–
Инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы (4)	–	–
Эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморагии, образование корочек (5)	–	–

Таблица 3

Оценочная шкала конъюнктивальной пробы

Оценочная шкала (балл)	I группа	II группа
Легкое покраснение слезного протока (1)	–	–
Покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице (2)	–	–
Покраснение всей конъюнктивы и склеры (3)	–	–

аллергическую реакцию животных [7]. В рамках каждой модели было сформировано по две группы из 8 животных каждая: I группа – испытание композиции Ag/ТАГА : хитозан-гель (1:1), II группа – испытание геля хитозана.

При использовании метода накожных аппликаций испытуемое вещество наносили на депилированную боковую поверхность, ближе к середине туловища, равномерным слоем на весь участок аппликации с помощью глазной стеклянной лопаточки на протяжении двух недель по 5 раз в неделю в виде пасты по 0,5 г. Реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале оценки кожных проб. Вторая депилированная боковая поверхность являлась контрольной. Кроме того, метод накожных аппликаций позволил выявить опасность развития неаллергического контактного дерматита.

Конъюнктивальная проба на аллерген позволяет выявить реакцию при слабой аллергизации и отрицательных кожных тестах. Стерильной стеклянной лопаткой исследуемые вещества закладывали под верхнее веко, в контралатеральный глаз (контрольный) глазной пипеткой с вытянутым тонким концом вводили 1 каплю воды. Реакцию учитывали через 15 мин (быстрая реакция) и через 24–48 ч (гиперчувствительность замедленного типа), оценивая ее по следующей шкале (в баллах): 1 – легкое покраснение слезного протока; 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице; 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры. Животных выводили из эксперимента на 14-е сутки передозировкой ингаляционного наркоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении всего эксперимента животные были активны, изменений в массе тела не выявлено. При пальпации в области накожных аппликаций животные вели себя спокойно, т.е. болевых ощущений и дискомфорта не испытывали; оценка их общего состояния на всем протяжении эксперимента – удовлетворительная.

В ходе исследования серебросодержащего сорбента на предмет аллергенности методом накожных аппликаций (табл. 2) и конъюнктивальной пробы (табл. 3) получены отрицательные результаты. В случае контакта исследуемой композиции и ее основы при закладке под верхнее веко реакция зудом не сопровождалась, гнойный офтальмит не развивался.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный серебросодержащий сорбент при накожных аппликациях и выполнении конъюнктивальной пробы не вызывает аллергических реакций и может быть рекомендован как активный фармацевтический ингредиент для наружных лекарственных или косметических средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляков Н.А. Энтеросорбция. Л.: Центр сорбционных технологий, 1991. 328 с.
2. Блажитко Л.И., Полякевич А.С., Бромбин А.И. и др. Применение препаратов серебра в медицине. Новосибирск, 2002. 20–25.

3. ГОСТ 4453-74. Уголь активный, осветляющий, древесный, порошкообразный. Технические условия. М., 1992. 32 с.
4. ГОСТ 6613-86. Сетки проволочные, тканые, с квадратными ячейками. Технические условия (с Изменением № 1). М., 1986.
5. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 51–62.
6. Няникова Г.Г., Маметнабиев Т.Э., Калинин И.П. и др. Области применения хитозана // Изв. СПбГТИ. 2007. (2). 20–26.
7. Няникова Г.Г., Маметнабиев Т.Э., Калинин И.П., Гепецкая М.В., Комиссарчик С.М., Елдинова Е.Ю. Области применения хитозана // Изв. С.-Петербург. гос. технолог. ин-та (техн. ун-та). 2007. 2. (28). Библиогр.: с. 20–26.
8. Рачковская Л.Н., Бгатов Н.П., Бородин Ю.И., Коненков В.И. Протекторные свойства сорбентов, возможности применения в лимфологии // Лимфология. Новосибирск: Манускрипт, 2012. 1063–1094.
9. Рачковская Л.Н., Бурмистров В.А., Попова Т.В. и др. Подходы к конструированию сорбентов // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: матер. XI Междунар. конф. Новосибирск, 2013. 264–268.
10. Рачковская Л.Н., Гельфонд Н.Е., Губина В.И., Эрымбаева А.Т., Булавченко А.И., Подлипская Т.Ю. Подходы к конструированию сорбентов // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: матер. XI Междунар. конф. Новосибирск. 2013. С. 269–271.
11. Рачковская Л.Н. Углеродминеральные сорбенты для медицины. Новосибирск: СО РСХН, 1996. 5–8.
12. Anisimova N.Y., Spirina T.S., Titov K.S. et al. Possibility of microorganism elimination from the blood using modified coal hemosorbents // Bull. Exp. Biol. Med. 2011. 151. (2). 273–274.
13. Chakravarty R., Dash A. Role of nanoporous materials in radiochemical separations for biomedical applications // J. Nanosci. Nanotechnol. 2013. 13. (4). 2431–2450.
14. Said J., Doodoo C.C., Walker M. et al. An *in vitro* test of the efficacy of silver-containing wound dressings against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in simulated wound fluid // Int. J. Pharm. 2014. 462. (1-2). 123–128.
15. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications // Progr. Polymer Sci. 2011. 36. (8). 981–1014.
16. Nikolaev V.G., Samsonov V.A. Analysis of medical use of carbon adsorbents in China and additional possibilities in this field achieved in Ukraine // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2014. 42. (1). 1–5.
17. Bowler P.G., Welsby S., Towers V. *In vitro* antimicrobial efficacy of a silver-containing wound dressing against mycobacteria associated with atypical skin ulcers // Wounds. 2013. 25. (8). 225–230.
18. Zhang T., Wang L., Chen Q., Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles // Yonsei Med. J. 2014. 55. (2). 283–291.

RESEARCH OF THE ALLERGENIC PROPERTIES OF NEW SILVER CONTAINING FINELY PARTICULATE SORBENT

Tatyana Viktorovna POPOVA¹, Tatyana Genrikhovna TOLSTIKOVA²,
Andrey Yurevich LETYAGIN¹, Lyubov Nikiforovna RACHKOVSKAYA¹

¹ *Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology*
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

² *N.N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry of SB RAS*
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentyev av., 9

The aim was to research the allergenic activity of silver containing finely particulate sorbent. Materials and methods. For the study we used novel excipient, consisting of two components: silver containing finely particulate sorbent and chitosan gel in ratio of one-to-one. The novel sorbent agent consists of thermally activated silica containing aluminum hydroxide modified with silver. The experiment was conducted on 32 Wistar female rats using skin application and conjunctival samples. The results. Silver containing finely particulate sorbent does not show negative allergenicity properties at skin application and conjunctival samples. Thus, it is concluded that the developed silver containing finely particulate sorbent does not cause any allergic reactions at skin application and conjunctival samples and can be recommended as an active pharmaceutical ingredient for external medical or cosmetic products.

Key words: silver-sorbents, allergy patch testing, skin application, conjunctival sample.

Popova T.V. – postgraduate student, e-mail: argenteum.popova@mail.ru

Tolstikova T.G. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of pharmacological investigation, professor

Letyagin A.Yu. – doctor of medical sciences, professor, leading researcher of laboratory for lymphoregulation, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Rachkovskaya L.N. – candidate of chemical sciences, head of the laboratory of biological active compounds

ВЛИЯНИЕ ЛИТИЙСОДЕРЖАЩЕЙ КОМПОЗИЦИИ НА ЭТАНОЛ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ И МОЗГЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Анастасия Анатольевна КОТЛЯРОВА¹, Андрей Юрьевич ЛЕТЯГИН¹,
Татьяна Генриховна ТОЛСТИКОВА², Наталия Петровна БГАТОВА¹,
Любовь Никифоровна РАЧКОВСКАЯ¹

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

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

Цель работы – оценить влияние литийсодержащей композиции на развитие патологических процессов в печени и мозге на модели хронической алкогольной интоксикации. **Материал и методы.** В работе использовались нелинейные мыши-самцы массой 25–30 г. Алкогольную интоксикацию моделировали путем внутрижелудочно-го введения в течение 5 недель 40%-го водного раствора этилового спирта (3 г/кг массы тела) в сочетании с 5%-м раствором этилового спирта в качестве питья *ad libitum*. Для проведения эксперимента мышей рандомизировали на 3 группы: 1-я получала физиологический раствор (интактный контроль), 2-я – этанол (негативный контроль), 3-я группа получала в течение двух недель этанол и с 15 по 35 сутки, на фоне продолжающегося введения этанола, литийсодержащую композицию в дозе 1120 мг/кг. Забор органов и крови на анализ осуществляли каждые 7 дней, начиная с третьей недели эксперимента. **Результаты и их обсуждение.** На основании биохимического и гистологического анализа выявлено, что у мышей экспериментальной группы (3-я группа) на фоне введения литийсодержащей композиции сорбента по сравнению с животными из группы негативного контроля (2-я группа) в мозге произошло уменьшение перинеуронального и перикапиллярного отека, снижение общего содержания гиперхромных нейронов; в печени уменьшились размеры межклеточного пространства. Таким образом, предлагаемая лекарственная форма лития (иммобилизованного на матрице-носителе) оказывает комплексное нейро- и гепатопротекторное действие, проявляя антитоксические свойства на фоне длительного введения этанола.

Ключевые слова: литий, хроническая алкогольная интоксикация, мыши, печень, префронтальная кора мозга, алюминия оксид.

Соединения лития используются в качестве препаратов, стабилизирующих настроение при биполярных аффективных расстройствах. В настоящее время интерес представляют нейропротективный и нейрорегенеративный эффекты лития – как при острых повреждениях мозга, так и при хронических нейродегенеративных заболеваниях, таких как старческая деменция, алкоголизм, болезнь Альцгеймера и др. [14–16, 20]. Препараты лития ограниченно используются в клинике из-за трудности подбора терапевтической дозы, необходимости мониторинга его concentra-

ции в крови, развития побочных эффектов за счет кумуляции в организме. Для улучшения фармакологических свойств комбинирование лития с другими веществами (например, иммобилизация на пористой основе) в перспективе может дать более длительный и безопасный терапевтический эффект, с меньшим количеством побочных реакций. Иммобилизация лития на пористую основу изменяет фармакокинетику лития, убирает резкий пик концентрации в плазме крови, поддерживая ее на терапевтическом уровне.

Котлярова А.А. – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории лимфорегуляции,
e-mail: kotlyarova.anastasiya@yandex.ru

Летягин А.Ю. – д.м.н., проф., ведущий научный сотрудник лаборатории лимфорегуляции,
e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Толстикова Т.Г. – д.б.н., проф., зав. лабораторией фармакологических исследований,
e-mail: tg_tolstikova@mail.ru

Бгатова Н.П. – д.б.н., проф., зав. лабораторией ультраструктурных исследований,
e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Рачковская Л.Н. – к.х.н., зав. лабораторией лимфорегуляции, e-mail: noolit@niikel.ru

Мозг является одним из основных органов-мишеней негативного воздействия этанола. В общем понимании нейродегенеративная патология независимо от этиологии включает следующие процессы: 1) снижение мозгового кровотока; 2) гипоксия; 3) энергодефицит; 4) глутаматная «эксайтотоксичность»; 5) осмотический стресс; 6) интенсификация свободнорадикального окисления; 7) апоптоз, гибель нейронов [1, 19]. Каждый из этих процессов является потенциальной мишенью для терапевтического воздействия. В этой ситуации литий может выступать в качестве антагониста сразу нескольких повреждающих факторов.

Протекторное действие лития при алкогольной нейродегенерации обуславливается его взаимодействием с сигнальными путями клеточного выживания и апоптоза [12, 22]. Литий в терапевтически значимых концентрациях ингибирует опосредованный NMDA-рецепторами вход кальция в клетку, который в свою очередь уменьшает последующую активацию JNK-, р38- и AP-1-зависимых сигнальных путей, тем самым ингибируя внутриклеточное увеличение кальция, а также снижает активность кальпаина и кальпаин-опосредованной активации проапоптотической киназной системы Cdk5/p25 [13, 17]. С другой стороны, литий может прямо или косвенно снизить активность GSK-3 за счет нескольких механизмов, что приводит к активации транскрипционных факторов, таких как CREB и HSF-1, и в результате – к индукции основных цитопротекторных белков (BDNF, VEGF, HSP70, Bcl-2). Уменьшение активности GSK-3 дополнительно снижает активность проапоптотического белка p53 и его влияния на Bcl-2. Индукция BDNF является важным механизмом в нейропротекции и литий-опосредованном нейрогенезе. Кроме того, за счет инактивации NF-κB литий оказывает противовоспалительный эффект.

Все вышеперечисленные эффекты лития: антиапоптотическое действие, уменьшение воспаления, усиление ангиогенеза и нейрогенеза, способствуют улучшению поведенческого и функционального восстановления после интоксикации алкоголем [18].

В последнее время все больше данных свидетельствуют о том, что в эксперименте фармакологические эффекты лития развиваются при дозах меньших, чем установленные в терапевтической практике: лабораторным грызунам назначают дозы лития около 1 ммоль/кг (6,9 мг/кг), в то время как амбулаторным больным – 900–1500 мг/сут (12,86–21,43 мг/кг) [4, 23]. Предлагаемая форма доставки лития дает возможность достижения терапевтических эффектов при низких концен-

трациях иона металла в плазме, что, возможно, позволит решить проблемы, возникающие при терапии препаратами лития и создаст перспективу расширения внедрения данной лекарственной формы в клиническую и амбулаторную практику.

Цель работы – оценить влияние литийсодержащей композиции на патологические процессы в печени и мозге (области Fr1-Fr3 префронтальной коры) на фоне длительной алкогольной интоксикации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 90 лабораторных белых мышках-самцах массой 25–30 г, которых содержали в виварии при свободном доступе к воде и пище (стандартный гранулированный корм) и естественной смене дня и ночи. Животные были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Все экспериментальные процедуры осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) и в «Положении об использовании животных в биомедицинских исследованиях».

Алкогольную интоксикацию вызывали ежедневным внутрижелудочным введением в течение 14 дней 40%-го раствора этанола в дозе 3 г/кг и свободным доступом к 5%-му раствору этанола в качестве питья *ad libitum* в течение 5 недель; алкоголизованные животные содержались без воды [3, 11]. Эта модель алкоголизма позволяет добиться более быстрого развития этанол-индуцированных изменений поведения по типу астенодепрессивного состояния и морфологических изменений в тканях (печени, мозге), чем при ненасильственном (свободный выбор этанол/вода) или полунасильственном (этанол как единственный источник питья) способах введения этанола [21].

В качестве фармакокорректора этанол-индуцированных повреждений мозга и печени использовали оригинальную пористую основу с иммобилизованной на ее поверхности солью лития, разработанную в НИИ клинической и экспериментальной лимфологии.

Исходная пористая основа представляет собой термоактивированный оксид-гидроксид алюминия с нанесенным на его поверхность кремнийорганическим полимером – полиметилсилоксаном. Литийсодержащую композицию получали путем физической адсорбции цитрата лития на поверхность сорбента.

Все животные были разделены на три группы по 30 мышей в каждой: 1-я группа в течение 5 недель получала физиологический раствор (интактный контроль), 2-я – раствор этилового спир-

та (негативный контроль), 3-я группа получала в течение двух недель этанол и с 15 по 35 сутки, на фоне продолжающегося потребления этанола, литийсодержащую композицию в дозе 1120 мг/кг. В пересчете на ионы лития доза составляла 5,6 мг/кг, она рассчитана в соответствии со справочником Машковского [9], в котором указана суточная дозировка применяемого в лечебных целях лития карбоната 2,1 г.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации. Объектами для светооптического исследования служили печень и мозг (области Fr1-Fr3 префронтальной коры головного мозга). Для светооптического исследования биологические образцы фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 ч в 1%-м растворе OsO₄ (Sigma, США) на фосфатном буфере (рН 7,4), обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим и изучали с помощью светового микроскопа LEICA DME (Германия).

Биохимические показатели крови: активность АлАТ и АсАТ, содержание общего белка, общего билирубина, определяли с использованием стандартных наборов (Bioson). Измерения выполняли на автоматическом фотометре – 5010 «Boehringer Mannheim» (Германия).

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. За достоверный уровень значимости принимали $p < 0,05$. Различия на уровне тенденции рассматривали при значениях $0,05 < p < 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что пятидневная алкоголизация животных приводит к увеличению содержания общего белка в 1,1 раза (см. таблицу). Ак-

тивность АлАТ и АсАт, а также уровень АСТ и общего билирубина достоверно не различаются у групп с введением алкоголя и интактного контроля. У группы с введением литийсодержащей композиции значимых отличий от интактного контроля в значениях биохимических показателей нет.

Исследованные биохимические параметры отражают функциональное состояние печени и используются в практике при диагностике патологических процессов, происходящих в печени как алкогольного, так и неалкогольного генеза [6]. Ферменты АсАТ и АлАТ присутствуют в значительных количествах в органах, таких как печень, почки, миокард, поэтому в норме их концентрации в крови незначительны. Билирубин – один из промежуточных продуктов распада гемоглобина, происходящего в гепатоцитах. При повреждении гепатоцитов, их цитолизе, происходит потеря клетками билирубина, АсАТ и АлАТ, и уровни этих биохимических маркеров в крови возрастают [2]. Повышение содержания общего белка выше нормы (для мышей норма составляет 52,0–57,0 г/л) является признаком грубой патологии печени [2, 6]. В нашем эксперименте этот показатель у мышей 2-й и 3-й групп повышен относительно контроля в 1,1 раза, что подтверждается морфологически компенсаторными реакциями паренхимы печени в ответ на введение этанола.

При макроскопическом исследовании печени животных контрольной группы наблюдается характерное дольчатое строение. Гепатоциты формируют четко выраженные радиально лежащие балки, между которыми находятся умеренно наполненные кровью венозные синусы. Венозные синусоиды в центре долек формируют центральную вену с четко выраженным просветом. Гепатоциты многогранной формы содержат 1–2 ядра, цитоплазма клеток равномерно окрашена, клетки плотно прилегают друг к другу. В клеточном матриксе присутствуют липидные включения, что можно считать нормой [8].

Через 5 недель введения этанола у животных группы негативного контроля наблюдается компенсаторная реакция паренхимы печени в виде увеличения количества многоядерных ге-

Таблица

Биохимические показатели сыворотки крови при алкогольной интоксикации

Группа	Активность АсАТ, ЕД/л	Активность АлАТ, ЕД/л	Содержание общего белка, г/л	Содержание общего билирубина, мкмоль/л
Контроль (1-я)	44,08 ± 3,14	37,04 ± 5,01	58,45 ± 1,8	3,06 ± 2,48
Негативный контроль (2-я)	35,73 ± 5,60	41,08 ± 2,43	62,84 ± 0,57*	3,20 ± 1,13
Опыт (3-я)	44,85 ± 2,71	33,68 ± 9,40	66,46 ± 4,05*	6,00 ± 3,35

Примечание. Обозначены отличия от величин соответствующих показателей группы контроля (*) при $0,05 < p < 0,1$.

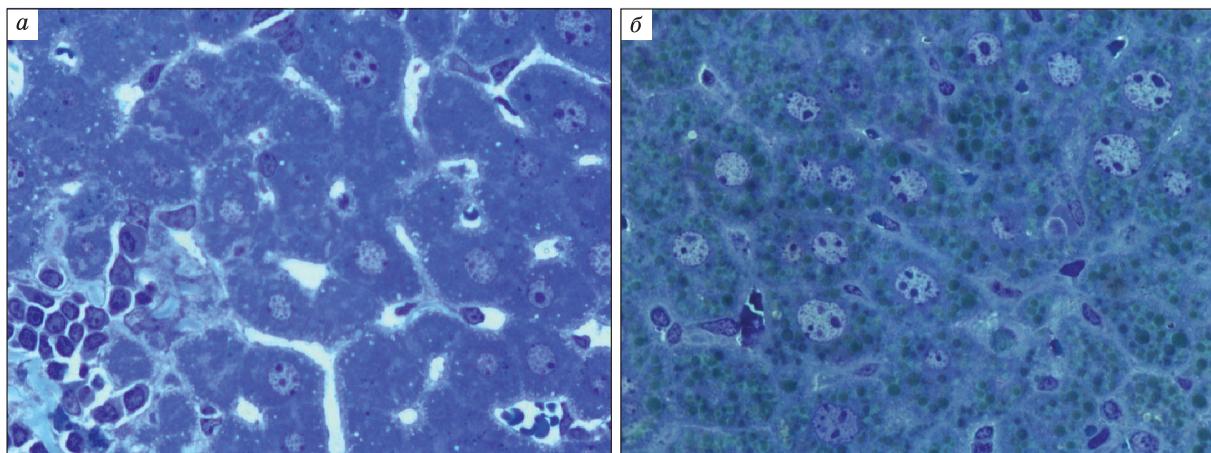


Рис 1. а – печень после 5-недельного внутрибрюшного введения 40%-го этанола (2-я группа), 21-е сутки. Расширение межклеточного пространства, инфильтрация лимфоидными и плазматическими клетками, зернистая дистрофия. б – печень после 5-недельного внутрибрюшного введения 40%-го этанола на фоне введения ЛЦ/С (3-я группа). Уменьшение размера межклеточного пространства, умеренная воспалительная реакция. Окраска толуидиновым синим, ув. $\times 400$

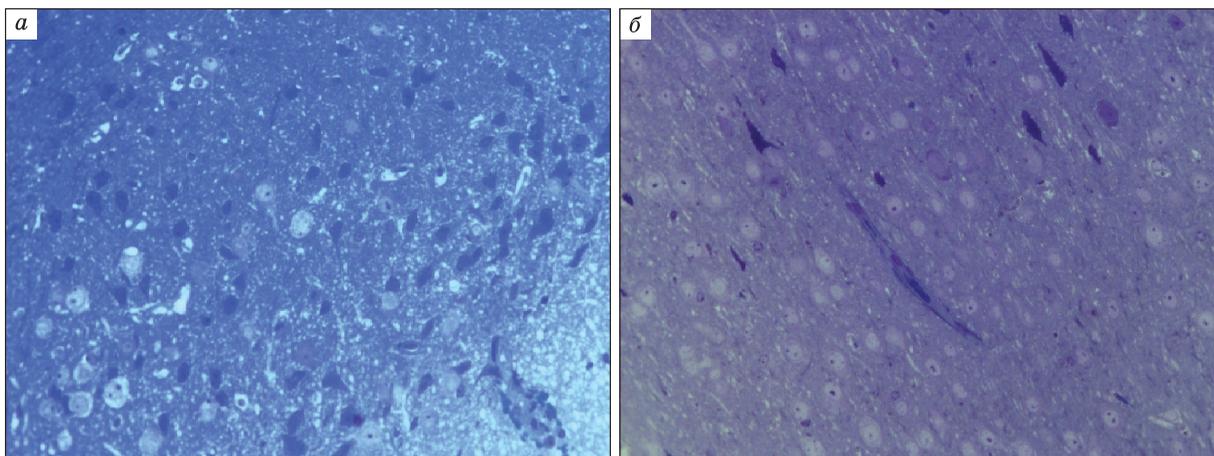


Рис 2. а – структура мозга после 5-недельного внутрибрюшного введения 40%-го этанола (2-я группа), 21-е сутки. В коре выявляется значительное количество гиперхромных нейронов. Ядра нейронов с выраженной конденсацией хроматина. б – структура мозга после 5-недельного внутрибрюшного введения 40%-го этанола на фоне введения ЛЦ/С (3-я группа). Умеренное набухание нейронов, расширение перинеурональных пространств. Окраска толуидиновым синим, ув. $\times 200$

паточитов. Архитектоника печени мышей на протяжении всего эксперимента была без явных патологических изменений, балочное строение печеночных долек не нарушено. Изменения печени мышей в условиях экспериментальной хронической алкогольной интоксикации характеризуются прежде всего мелкокапельной жировой дистрофией гепатоцитов и расширением межклеточного пространства. В междольковой соединительной ткани, портальных зонах наблюдалась инфильтрация лимфоидными и плазматическими клетками [5].

При алкогольном поражении печени на фоне введения литийсодержащей композиции происходило уменьшение межклеточного простран-

ства, наблюдались единичные нейтрофилы, в перипортальной зоне – слабовыраженная воспалительно-клеточная инфильтрация портальных трактов нейтрофилами, также можно отметить наличие жировой дистрофии.

В структуре ткани области Fr1-Fr3 префронтальной коры при алкоголизации наблюдались нарушения микроциркуляции в виде неравномерного кровенаполнения сосудов, стазов. Также отмечалось расширение перинеурональных и периваскулярных пространств, которое является признаком диффузного отека ткани мозга.

При длительном воздействии этанола изменения в нервной ткани в эксперименте носят адаптивный характер и в большинстве своем явля-

ются обратимыми. Наиболее часто встречаются нейроны с изменением тинкториальных свойств по гипо- и гиперхромному типу. Подобные изменения в литературе определяют как пограничные и обратимые, на их основе в дальнейшем могут возникать как альтеративные, так и адаптационные изменения [7, 10]. Пограничные изменения являются «срочной» адаптивной реакцией клеток на внешние воздействия и отражают промежуточное состояние нейронов между вариантами биологической нормы и патологии. Основная масса нейронов имеет структурно-функциональную организацию, соответствующую классическим представлениям о строении нервной клетки. В ткани практически отсутствуют пикноморфные нейроны и клеточные тени, наличие которых считается маркером деструктивных (альтеративных) изменений в мозге.

Морфологическое исследование ткани мозга животных на фоне введения литийсодержащей композиции показало, что на 14–21-е сутки по сравнению с нелечеными животными структурные изменения были менее выраженными. Уменьшалось общее содержание гипо- и гиперхромных нейронов; можно отметить слабовыраженный интерстициальный отек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании биохимического и гистологического анализа у мышей на фоне алкогольной интоксикации выявлены функциональная напряженность гепатоцитов, умеренный отек и сморщивание нейронов, которое имеет преимущественно обратимый характер. Гистологическое исследование тканей печени и мозга мышей, получавших исследуемый комплекс, показало, что его введение значительно улучшает гистологическую картину этих органов. Предлагаемая лекарственная форма лития (иммобилизованного на матрице-носителе) оказывает комплексное нейро- и гепатопротекторное действие, проявляя антитоксические свойства на фоне длительного введения этанола.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батухтина Е.И. Психонейроиммунологические закономерности формирования зависимости от психоактивных веществ: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2014.
2. Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е. и др. Клиническая биохимия: учебное пособие / ред. В.А. Ткачук. 3-е изд., испр. и доп. 2008. 264 с.
3. Головенко Н.Я., Жук М.С., Зиньковский В.Г. и др. Фармакокинетика этанола у мышей с различной

алкогольной мотивацией // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. 132. (9). 281–284.

4. Замощина Т.А. 35 лет изучения солей лития // Бюл. сиб. медицины. 2006. 5. (Прил. 2). 26–29.

5. Ищенко И.Ю., Мичурина С.В. Воздействие сорбента «Энтеросгель» на тканевый микрорайон печени и регионарные лимфатические узлы у крыс с хроническим токсическим гепатитом // Бюл. СО РАМН. 2006. (1). 67–72.

6. Лапин А.А. Клинико-морфологические критерии в диагностике алкогольной болезни: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Волгоград, 2007.

7. Лапин А.А., Лапина А.А. Морфогистохимическая характеристика сосудистых сплетений головного мозга при острой и хронической алкогольной интоксикации в эксперименте // Естественные науки. 2006. (3). 27–29.

8. Манских В.Н. Патоморфология печени лабораторной мыши: подводные камни на пути к верному диагнозу. <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/Patologiya-pecheni-metodichka-dlya-sayta.pdf>

9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2005. 1216 с.

10. Федоров В.П., Афанасьев Р.В., Сзибнева Н.В., Маслов Н.В. Морфофункциональное состояние нейроцитов головного мозга при повышенном радиационном фоне // Морфология. 2010. 137. (4). 200.

11. Bertola A., Mathews S., Ki S.H. et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) // Nat. Protoc. 2013. 8. (3). 627–637.

12. Chakraborty G., Saito M., Mao R.F. et al. Lithium blocks ethanol-induced modulation of protein kinases in the developing brain // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. 367. (3). 597–602.

13. Chandler L.J., Sutton G. Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner // Alcohol Clin. Exp. Res. 2005. 29. (4). 672–682.

14. Chiu C.T., Chuang D.M. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders // Pharmacol. Ther. 2010. 128. (2). 281–304.

15. Chuang D.M. Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? // Crit. Rev. Neurobiol. 2004. 16. 83–90.

16. Chuang D.M., Chen R.W., Chalecka-Franaszek E. et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases // Bipolar Disord. 2002. 4. 129–136.

17. Einat H., Yuan P., Gould T. D., Li J. et al. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation // J. Neurosci. 2003. 23. 7311–7316.

18. Hashimoto R., Takei N., Shimazu K. et al. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor

and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity // *Neuropharmacology*. 2002. 43. (7). 1173–1179.

19. Muresanu D.F. Neuroprotection and neuroplasticity – a holistic approach and future perspectives // *J. Neurol. Sci.* 2007. 257. (1-2). 38–43.

20. Noble W., Planel E., Zehr C. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. 102. 6990–6995.

21. Tabakoff B., Hoffman P.L. Animal models in alcohol research // *Alcohol Res. Health*. 2000. 24. (2). 77–84.

22. Young C., Straiko M.M.W., Johnson S.A. et al. Ethanol causes and lithium prevents neuroapoptosis and suppression of pERK in the infant mouse brain // *Neurobiol. Dis.* 2008. 31. 355–360.

23. Zhu Z.F., Wang Q.G., Han B.J., William C.P. Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice // *Brain Res. Bull.* 2010. 83. (5). 272–277.

THE EFFECT OF A LITHIUM-CONTAINING COMPOSITION ON ETHANOL-INDUCED CHANGES IN LIVER AND BRAIN WITHIN THE EXPERIMENTS ON MICE

Anastasiya Anatolevna KOTLYAROVA¹, Andrey Yurevich LETYAGIN¹,
Tatyana Genrikhovna TOLSTIKOVA², Nataliya Petrovna BGATOVA¹,
Lyubov Nikiforovna RACHKOVSKAYA¹

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

² *N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of SB RAS*
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentev av., 9

The work is aimed to assess the effect of lithium-containing composition on pathogenic pathway in liver and brain based on model of chronic alcohol abuse. Materials and methods. During the work we used nonlinear mice – males, weighing 25–30 g. For studies mice were randomly assigned to groups: first group was intact animals, mice from second and third groups received 40 % ethanol solution (3 g per 1 kg body weight) along with 5 % ethanol solution as a free drinking every day for 5 weeks; in addition starting from the third week of the experiment mice from the third group were administered suspension lithium-containing composition intragastrically. Starting from the third week of the experiment organs and blood samplings were taken every seven days for analysis. Results and discussion. Based on biochemical and histological analysis we determined that after lithium-containing composition administration it was observed reduction perineural and perivascular edemas in brain, reduction of total content of hyperchromic neurons and intercellular space reduction in liver among mice from the third intervention group in comparison with another negative control group. Proposed drug dosage form of lithium has a comprehensive protection effect on neurons and hepatic cells, it shows antitoxic property in case of chronic alcohol abuse.

Key words: lithium, chronic alcohol intoxication, mice, liver, prefrontal cortex F1-F3.

Kotlyarova A.A. – postgraduate student, junior researcher of the laboratory of lymphoregulation,
e-mai: kotlyarova.anastasiya@yandex.ru

Letyagin A.Yu. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory of lymphoregulation, professor,
e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Tolstikova T.G. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of pharmacological investigation, professor

Bgatova N.P. – doctor of biological sciences, head of the laboratory ultrastructural researches, professor,
e-mai: n_bgatova@ngs.ru

Rachkovskaya L.N. – candidate of chemical sciences, head of the laboratory of lymphoregulation,
e-mai: noolit@niikel.ru

ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ НАКОПЛЕНИЯ В ЕВРОПЕ: ПРОБЛЕМА НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Александр Борисович ПУПЫШЕВ

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

НИИ физиологии и фундаментальной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Рассмотрены тенденции изучения лизосомных болезней в Европе, связанные с особым интересом к аутофагии, нейропатологии и новым терапевтическим технологиям. Показано, что торможение аутофагии способствует накоплению аномально свернутых белков, индукции стресса эндоплазматического ретикулума, агрегации белков и формированию признаков нейропатологии. Примером является влияние болезни Гоше (дефект β -глюкоцереброзидазы) на формирование болезни Паркинсона. Синдром лизосомного накопления и старение тормозят активность эндоцитоза и аутофагии. Поэтому в работе представлены пути терапевтических и/или нейропротективных воздействий на усиление собственных защитных механизмов клеток, таких как аутофагия, белки TFEB, Hsp70. Показана возможность частичного предупреждения дефектов скелета активацией аутофагии. Существенный прогресс достигнут в генной терапии лизосомных болезней аденовирус- и лентивирус-ассоциированными генами недостающих ферментов и в их интракраниальном применении для устранения нейропатологии. Рассмотрены и другие пути терапевтических вмешательств.

Ключевые слова: лизосомы, лизосомные болезни накопления, нейродегенерация, аутофагия, фермент-заместительная терапия, генная терапия.

Лизосомные болезни накопления (ЛБН) представляют собой редкие наследственные заболевания, связанные с потерей активности отдельных лизосомных ферментов или их кофакторов. К ним относятся болезнь Гоше (дефект β -глюкоцереброзидазы), болезнь Нимана – Пика (недостаточность сфингомиелиназы), болезнь Помпе (дефект α -1,4-глюкозидазы), болезнь Тея – Сакса (дефект β -гексозаминидазы А), метахроматическая лейкоцисторфия (дефект арилсульфатазы А), мукополисахаридозы 7 типов, муколипидозы 4 типов и др. Всего насчитывается около 50 таких заболеваний, нередко приводящих к гибели в раннем возрасте. Наиболее выраженные изменения распространяются на поражение скелета, нейропатологию, висцеральную органо-мегалию.

Поскольку ЛБН являются моногенными заболеваниями, возможны достаточно универсальные подходы к их коррекции. Активно применяется заместительная энзимотерапия (ЗЭТ), изучаются возможности трансплантации гематопоэтических и нейрональных стволовых клеток, генной терапии, субстратной депривации и других подходов.

Исследовательские ресурсы Европы объединены в рамках Европейской исследовательской

группы по лизосомным болезням (ESGLD), существующей с 1978 г. и включающей в свой состав ученых 22 стран. Очередное рабочее совещание ESGLD в Неаполе (1–4 октября 2015 г.) было в значительной мере посвящено механизмам формирования нейропатологии при ЛБН и конструктивным средствам патогенетической терапии этих заболеваний.

Совещание сопровождалось предшествующим курсом лекций по лизосомам и лизосомным болезням, включавшим презентации E. Lloyd-Evans «Molecular pathogenesis of LSD», K. Settembre «Autophagy», T. Cox «Lipid degradation and lipid storage diseases», G. Parenti «Glycosaminoglycan degradation and mucopolysaccharidoses», H. Aerts «Gauche disease», B. Bigger «Therapy of lysosomal storage diseases».

Почетную лекцию, посвященную важнейшим историческим событиям в изучении ЛБН, представил бывший президент ESGLD профессор Kurt von Figura (Германия) [34], отметивший достижения E. Neufeld, W. Sly, S. Kornfeld, R. O'Brady и многих других признанных ученых, а также представивший обзор новых терапевтических подходов, в частности возможности исправления генетического дефекта фермента его посттрансляционной модификацией. Так, дефект

множественной сульфатазной недостаточности может исправляться заменой в арилсульфатазе А сульфгидрильной группы модифицированного глицина на S α -формильную группировку, и эта замена осуществляется коротким мотивом, ген которого в дальнейшем клонировали и использовали для получения рекомбинантных сульфатаз с терапевтической активностью.

Программа совещания включала сессии, посвященные биологии лизосом, механизмам ЛБН, анимальным моделям, терапии ЛБН. Особое внимание было уделено фундаментальным аспектам ЛБН и биологии лизосом, что во многом связано с глубокими исследованиями лизосомной биологии и патологии, проводимыми организаторами совещания под руководством проф. Andrea Ballabio [2]. Ранее значительное место уделялось клиническим исследованиям ЛБН, для которых существуют и другие медицинские форумы, такие как Lysosomal Disease Network's Annual World Symposium, WORLD Symposium, Symposium on MPS and related diseases и т.д.

Среди приглашенных докладчиков были Anthony Galione (Oxford) «Two-pored channels and endolysosomal calcium signalling», Timothy Cox (Cambridge) «Gaucher disease: an exceptional source of treasure», David Rubinsztein (Cambridge) «Autophagy and neurodegeneration», Marja Jaattela (Copenhagen) «Control of lysosomal stability and autophagosome maturation by sphingomyelin metabolism: opportunities for therapeutic interventions».

В своей лекции Т. Кокс показал комплексное поражение систем организма при болезни Гоше. В ее лечении используется весь терапевтический арсенал: обновление популяции макрофагов трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, субстратная депривация (подавление синтеза сфинголипидов), генная терапия и т. д. [8]. На фоне широкого применения ЗЭТ цередазой (β -глюкоцереброзидазой) показателен пример эффективности лечения: за 20 лет энзимотерапии практически вылечен пациент, живущий в настоящее время полноценной жизнью и ставший отцом троих детей.

Значительное внимание было уделено механизмам формирования нейродегенерации при ЛБН и роли аутофагии в выживании клеток при синдроме лизосомного накопления. В лекции Д. Рубинштейна были показаны некоторые пути влияния аутофагии на процессы нейродегенерации. Так, она снижает накопление агрегатов белков (таких как α -синуклеин, хантингтин, тау-белок) и их токсичность, в конечном счете препятствуя развитию соответственно болезни Паркинсона (БП), болезни Хантингтона, болезни Альцгеймера. Аутофагия способна повышать

устойчивость клеток к апоптозу, конкурируя за мессенджеры клеточного выживания и подавляя про-апоптозную сигнализацию. Отмечено, что разрабатывается новая стратегия стимуляции неканонических путей аутофагии, в частности, посредством фосфатидилинозитол-5-фосфата, в дополнение к классической регуляции аутофагии, используемой для повышения выживаемости клеток [30].

М. Яатела представила свою концепцию влияния стабильности лизосом на клеточное выживание и зависимые от лизосом возможности новых терапевтических воздействий [15]. Она показала, что мутации различных лизосомных белков вызывают в целом снижение стабильности лизосомных мембран. Освобождение лизосомных катепсинов В и D может приводить к атаке митохондрий пептидами Вах и Вак, вызывающими пермеабиллизацию мембран митохондрий и освобождение цитохрома с, запускающего апоптозный каскад активации каспаз. Важно следить за проницаемостью мембран лизосом путем использования новых прижизненных маркеров, таких как лектин галактин, связывающийся с лизосомной β -галактозидазой и видимый благодаря внедрению в клетки генетической конструкции mCherry-Gal3 (экспрессия конъюгата окрашенного белка mCherry с галактином) [1]. Получены данные в пользу того, что метастазирование связано с дисфункцией лизосом, опосредуется освобождением цистеиновых катепсинов. Такие белки, как Hsp70, серпины, цистатины, препятствуют освобождению катепсинов. Hsp70 оказывает эффект посредством связывания с бис-(моноацилглицеро)фосфатом (ВМР) мембраны лизосом и активацией кислой сфингомиелиназы, которая, судя по приведенным данным, обладает мембраностабилизирующим действием. В результате Hsp70 препятствует лизосомной патологии при лизосомных болезнях накопления. Например, при болезни Нимана – Пика С он улучшает моторную функцию мозга, а катионные амфифильные препараты (лоратидин, тетрафенадин и др.) ингибируют этот фермент и способствуют гибели клеток, что важно для онкотерапии. Кроме того, кислая сфингомиелиназа способствует формированию аутофагосом, и ее ингибирование тормозит репаративную аутофагию и помогает гибели онкотрансформированных клеток.

В последнее время лизосомные ферменты рассматриваются как потенциальные маркеры в диагностике такой нейропатологии, как болезнь Альцгеймера, БП и деменция с тельцами Леви. Повышенный уровень лизосомных протеаз катепсинов В и D выявлен в спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и в мозге пациентов с болезнью

Альцгеймера, при БП в СМЖ увеличена активность лизосомных β -галактозидазы и катепсина E (постер А. Tasegian, Италия) [32]. Однако в других исследованиях найдено снижение активности β -глюкоцереброзидазы в СМЖ пациентов с БП и деменцией и рост активности β -гексозаминидазы при БП. Такие модуляции активности ферментов при рассматриваемой нейропатологии могут быть результатом регуляторных изменений лизосом мозга. Однако взаимосвязь этих показателей СМЖ и мозга пока не ясна, неизвестно происхождение лизосомных ферментов СМЖ. Полагают, они могут попадать в СМЖ из нейронов головного мозга в ходе секреторно-опосредованного переноса ферментов из аппарата Гольджи в лизосомы, возможно проникновение и из других тканей вследствие поражения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Лизосомная кислая α -маннозидаза распространена повсеместно в организме человека в двух формах – А и В. В крови преобладает ее «промежуточная» форма с оптимумом рН 5,5. Профиль изоформ фермента в СМЖ был сходен с таковым фронтальной коры головного мозга (наличие изоформ А и В), но отличался от профиля плазмы крови. И наоборот, в СМЖ не найдено «промежуточной» формы фермента. Таким образом, α -маннозидаза поступает в СМЖ из мозга и может отражать его нейропатологию, связанную, например, с БП.

В докладе R. Bartolomeo (Италия) сообщалось, что синдром лизосомного накопления подавляет такие важнейшие клеточные функции, как эндоцитоз и аутофагия. А аутофагия в свою очередь является механизмом поддержания клеточного гомеостаза, регулируемым посредством сенсоров комплекса mTORC1. При использовании анимальной модели заболевания найдено, что этот комплекс вовлечен в формирование мукополисахаридоза MPS VII [3]. Выделенные из таких мышей хондроциты обнаружили низкую чувствительность mTORC1 к недостаточности питательного обеспечения, зависимость от белка Raptor этого комплекса. Выявленный эффект влиял на рост скелета. Генетическая или фармакологическая коррекция сигнализации mTORC1 восстанавливала активность аутофагии в хондроцитах и позитивно влияла на формирование скелета.

Связь нейродегенерации с аутофагией прослежена в экспериментах по осмотическому тестированию аутофагии, являющемуся функциональным тестом на активность аутофагии (содержание аутофаголизосом) (постер А.Б. Пупышева, Россия) [25]. Тест показал достаточную чувствительность при индукции аутофагии в печени голоданием (1 и 2 суток), при оценке ли-

пидоза печени, вызванного поллоксамером P-407 (постер Т.А. Короленко) [19], и наконец при лечении преждевременного старения крыс линии OXYS цефтриаксоном. Препарат вызывал рост осмотической чувствительности лизосом в передней коре мозга крыс OXYS, что соответствует индукции протективной аутофагии.

Моделирование цероидного липофусциноза нейронов (NCL) нокаутированием гена *Cln7/Mfsd8*, кодирующего белок лизосомной мембраны *Cln7*, дало жизнеспособных фертильных мышей с признаками нейродегенерации и преждевременной гибелью (доклад L. Brandenstain, Германия). Важно, что в различных отделах головного мозга обнаружено торможение аутофагового потока, по-видимому, вносящее свой вклад в формирование нейропатологии [5].

В других экспериментах NCL моделировали получением мышей с генотипом *Ppt1^{-/-}* (дефект гена *Cln1*) и нашли, что патология спинного мозга развивается раньше поражения головного мозга (доклад J. Cooreg, Англия) [23]. Повреждение мозга не устранялось генной терапией переднего мозга, в связи с чем выбрали терапевтической мишенью спинной мозг, ставший объектом ЗЭТ ферментом пальмитоил-белок-тиоэстераза-1 (PPT1). Лечение ферментом путем введения его в СМЖ дало ослабление патологии спинного мозга, снижение синаптической недостаточности и перспективу использования подхода при выраженной патологии спинного мозга, вызываемой NCL.

На модели NCL (CLN5 и CLN6) овец воспроизведены нейродегенерация и лизосомное накопление, свойственные этим лизосомным болезням (доклад N.L. Mitchell, Новая Зеландия) [22]. Изучали возможности лечения с помощью адресуемой в ЦНС вектор-аденоассоциированной (AAV) генотерапии. Овцам с генотипом *CLN5^{-/-}* вводили генетическую конструкцию AAV9-CLN5 внутрь коры и желудочка мозга, и через 18 месяцев нашли коррекцию их фенотипа, нормализацию внутричерепного объема, улучшение когнитивных функций мозга и нейрофизиологии в целом. Введение конструкций в желудочки мозга давало распространение агента по всей ЦНС, оказывало лучший эффект, чем инъекции в кору мозга. Аналогично, терапевтический эффект получен для овец с генотипом *CLN6^{-/-}* (модель болезни Баттена) и конструкции AAV9-CLN6.

Активно изучается связь ЛБН с другими заболеваниями на примере болезни Гоше (дефект β -глюкоцереброзидазы, кодируемой геном *GBA*) и БП (доклад М. Horowitz, Израиль), которые повышают риск возникновения друг друга. При болезни Гоше экспрессия мутантной глюкоцеребро-

зидазы сопровождается стрессом ЭПР, ведущим к клеточному ответу на нарушение сворачивания белков (unfolded protein response, UPR). А эти изменения, в свою очередь, характерны для формирования БП. На модели болезни Гоше (*Drosophila melanogaster* с генотипом *GBA^{-/-}*) нашли сокращение срока жизни, поражение дофаминовых нейронов и поведенческих реакций, накопление α -синуклеина, свойственные БП, хотя на гетерозиготы эти изменения не распространялись [21, 28]. Коррекция патологии с помощью фармакологического шаперона амброксола, снижающего накопление мутантной β -глюкоцереброзидазы в ЭПР, исправляла дефект роста мутанта 83GG. Таким образом, при болезни Гоше накопление мутантного фермента с дефектом конформации ведет к индукции стресса ЭПР, гибели дофаминовых нейронов, формированию признаков БП.

Пациенты с болезнью Гоше имеют 5-кратный риск развития БП в сравнении с нормальными людьми. Найдено, что глюкозилцерамид, накапливающийся при болезни Гоше, обладает стабилизирующим действием на растворимые формы α -синуклеина (постер M.R. Sessaгini, Италия). Как следствие, недостаточность β -глюкозилцереброзидазы может способствовать накоплению и агрегации α -синуклеина. При БП нашли снижение активности фермента в СМЖ (особенно на ранней стадии) и увеличение содержания олигомерного α -синуклеина по сравнению с величинами показателей у пациентов с когнитивными нарушениями или деменцией. Эти два параметра вкуче с повышенным уровнем β -гексозаминидазы позволяют отличить БП от другой нейропатологии. В сравнении со здоровыми людьми активность β -глюкозилцереброзидазы в СМЖ была немного меньше, а активность катепсина Е существенно больше. Для изолированных фибробластов при БП (независимо от болезни Гоше) обнаружена высокая активность β -гексозаминидазы и низкая активность β -глюкозилцереброзидазы, которая распространялась и на мозг. В целом, показано, что анализ активности лизосомных ферментов в СМЖ дает надежные и воспроизводимые диагностические результаты [7].

При болезни Альцгеймера отмечают ранние изменения лизосом, иногда предшествующие накоплению токсичного предшественника β -амилоида (APP) (доклад M. Damme, Германия). Среди генов предрасположенности к болезни выявлен ген *Pld3*, кодирующий фермент лизосом фосфолипазу D, с высокой активностью в ткани мозга. Для генома *Pld3^{-/-}* найдена мягкая форма нейропатологии, включая нарушение поведенческих реакций, но без влияния на уровень APP

in vivo, а повышенная экспрессия фермента в культуре клеток ведет к существенному снижению содержания патогенного APP и экспрессии лизосомных ферментов [14].

В лечении ЛБН важнейшее значение имеет устранение нейропатологии, и поэтому активно изучаются возможности универсального торможения нейродегенерации. К числу таких подходов относится использование рекомбинантного белка теплового шока Hsp70, являющегося одновременно шапероном (постеры T. Kirkegaard, C. Fog-Tonnesen, Дания). Авторы нашли, что он способствует связыванию ферментов деградации сфинголипидов с их кофактором VMP *in vitro* и ослабляет патологию лизосом первичных культур дефектных фибробластов от 14 пациентов с 9 ЛБН. Hsp70 эффективно проникал в различные органы мыши, включая ЦНС, ингибируя накопление гликозилсфинголипидов на мышечных моделях болезней Фабри, Зандхофа, Нимана – Пика С, и эффективно ослабляя неврологические симптомы в двух последних моделях. Дополнительное применение аримокломола, являющегося фармакологическим низкомолекулярным коиндуктором Hsp70, усиливает действие Hsp70 в устранении нейропатологии и симптомов ЛБН. Таким образом, полученные результаты по применению Hsp70 обнадеживают в поиске новых путей терапии ЛБН [16, 17].

В докладе J. Klumperman (Голландия) представлена роль белка лизосом Vps41, участвующего в слиянии кислых везикул, в транспорте белка лизосом LIMP2, являющегося рецептором фермента β -глюкозилцереброзидазы, дефицит которой приводит к болезни Гоше. Оказалось, что этот белок регулирует транспорт белков LAMP-1, LAMP-2, NPC-1, LIMP-2/GBA из аппарата Гольджи в лизосомы, но в то же время способствует слиянию эндосом с лизосомами. Полагают, Vps41 нужен для поддержания стабильности лизосом и липидного гомеостаза. В конечном счете он может быть протективным фактором в противодействии нейродегенерации [18].

На модели индукции липидоза, вызываемого ингибированием липаз полоксамером P-407, показано резкое увеличение уровня атерогенных липидов крови, превышающее таковое при семейной гиперхолестеринемии (постер Т.А. Короленко, Россия). Липидоз выражен в макрофагах печени, сопровождается ростом активности хитотриозидазы и имеет признаки лизосомной перегрузки, способной вызвать вторичные клеточные изменения [19].

В формировании ЛБН заметная роль отводится активности транскрипционного фактора EB (TFEB), регулирующего экспрессию лизо-

сомных гидролаз, везикулярный транспорт и аутофагию (доклад S. Raimo, Италия). Его гиперэкспрессия у мышей приводит к подавлению симптомов ЛБН. Однако при исследовании ряда ЛБН (MPS IIIA, MSD, болезни Зандхофа) нашли увеличение транскрипции фактора в нейронах и микроглии и его ядерную транслокацию, соответствующую активному состоянию фактора. В дальнейшем на модели болезни Гоше, вызываемой кондуриitol-B-эпоксидом (ингибитором β -глюкоцереброзидазы), обнаружили ядерную транслокацию TFEB в клетках HeLa. Как и для других ЛБН, повышенная экспрессия TFEB вела к снижению лизосомного накопления (судя по уровню глюкоцереброзидов). А для мышей с дефицитом фактора наблюдали накопление липидов в клетках печени и рост накопительного (лизосомного) компартмента [26]. Таким образом, в ходе формирования ЛБН TFEB играет протективную роль, связанную с клеточным очищением от накапливающегося материала.

При изучении мукополисахаридоза MPS IIIA на анимальных моделях и культурах нейронов в пресинаптических областях нейронов нашли прогрессивную потерю растворимого α -синуклеина и белка CSP α (cysteine string protein α), что в свою очередь негативно влияет на уровень белка слияния везикул SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor) в нервных окончаниях (доклад I. Sambri, Италия). Отмечено накопление нерастворимого α -синуклеина, а растворимый α -синуклеин, наоборот, помогал рециклированию синаптических везикул. Гиперэкспрессия CSP α в мозге дефектных мышей восстанавливала уровень SNARE и способствовала работе синапсов и подавлению нейродегенерации [31]. Таким образом, при ЛБН может нарушаться функционирование пресинаптических везикул, зависимое от гомеостаза SNARE в нервных окончаниях.

В связи с тем, что аутофагия универсально вовлечена в формирование ЛБН и нейродегенерацию, предложено контролировать мутации аутофаголизосомного пути с помощью лизоплекса (Lysoplex) – системы адресного секвенирования нового поколения (Targeted Next Generation Sequencing, TNGS) (постер G. DiFruscio, Италия). Этот подход позволяет различать цепочки 891 гена, вовлеченного в функционирование лизосом, эндоцитоз и аутофагию. Лизоплекс опробован на 14 ЛБН и затем на пациентах с клиническим фенотипом NCL с неизвестными мутациями. Были идентифицированы патогенные мутации у 67 % пациентов, большинство которых не поддавались выявлению обычными технологиями секвенирования. Кроме того, результаты сравнили с работой

общепринятого полного экзомного секвенирования (WES). В среднем было идентифицировано на 50 % больше подтвержденных изменений аминокислотного состава и укорочения пептидов в расчете на 1 ген. В целом обнаружили 61 укорочение последовательностей и 488 миссенс-мутаций с высокой вероятностью потери функции 316 генов [9]. Таким образом, лизоплекс дает современный каталог кодовых вариаций генов кислого везикулярного аппарата и позволяет соотнести их с клеточными изменениями, связанными с ЛБН.

В другом исследовании (постер M. Blomqvist, Швеция) с помощью такого подхода обследовали 20 пациентов с лизосомными или пероксисомными болезнями. Ранее с помощью секвенирования Сэнджера нашли патогенные мутации у всех этих пациентов. Обычный набор мишеней включал 60 экзонов и фланк-области 90 генов. Создание библиотеки было выполнено с помощью платформы Sure Select QXT (Agilent). В результате ожидаемые патогенные мутации были найдены у всех 20 пациентов. В коммерческой базе, охватывающей 281 вариант, примененная панель показала чувствительность 100 % и специфичность 97 % [4]. Таким образом, получен полезный инструмент для выявления патогенных мутаций ЛБН облегченным методом.

В лаборатории Брайана Биггера (Манчестер, Англия) осуществлена преклиническая подготовка геномной терапии мукополисахаридоза MPS IIIA (постер S. Ellison). Это заболевание связано с дефектом N-сульфоглюкозамин-сульфогидролазы, лизосомным накоплением гепарансульфата, и поражает прежде всего головной мозг. ЗЭТ нормальным ферментом неэффективна в силу наличия ГЭБ. Проблему может решить трансплантация гемопоэтических стволовых клеток благодаря поселению моноцитов в мозг и выработке ими недостающего фермента. Этот подход оказался полезным в лечении мукополисахаридоза MPS I (синдром Пфаундлера – Гурлер). Но для лечения MPS IIIA выработка недостающего фермента адресованными моноцитами оказалась недостаточной. Поэтому специально повысили продукцию фермента стволовыми клетками с помощью внедрения геномной конструкции лентивирусного вектора с геном нормального фермента. В конечном счете удалось увеличить содержание фермента в мозге до 11 % от нормы, что исправляло поведенческие реакции, устраняло нейровоспаление, существенно повышало выживание мышей, нормализовало уровень гликозаминогликанов и размеры лизосом. Преклиническое испытание токсичности примененной конструкции на CD34⁺-клетках человека показало, что при 10-, 20-кратном увеличении уровня фермента относи-

тельно нормы токсичность воздействия не росла, равно как частота трансформации и другие параметры лентивирусной доставки генов, применяемой в клинике. В 2016 г. планируется проведение I/II фаз клинических испытаний конструкции в лечении MPS IIIA человека [10].

Лентивирусные конструкции оказались полезными в разработке лечения и мукополисахаридоза MPS II (дефект идуонат-2-сульфатазы, ген *IDS*) (постер Н. Gleitz, Англия). Использовали лентивирусные векторы третьего поколения с миелоид-специфичным промотором *hCD11b*, нацеленные на мозг и ассоциированные с генами *IDS*, *SUMF1* и *TFEB* [13]. Показано, что они повышают уровень соответствующих белков *in vivo*, а также улучшают поведенческие реакции мышей с MPS II. Более того, получили мышей, нокаутированных по гену *Ids*, их состояние соответствует высокой остроте заболевания. На них также получен позитивный неврологический эффект, отслеживаемый в динамике возраста мышей до 8 месяцев.

Для коррекции мышинной модели болезни Зандхофа использовали аденоассоциированную (AAV) доставку корригирующих генов (постер L. Rouviere, Франция). Вектор AAV9 с геном гексозаминидазы В и промотором PGK вводили внутривенно. Такое лечение повышало срок жизни животных со 120 дней до нормы (не менее 700 дней) и предотвращало основные симптомы заболевания, включая нейропатологию. Найдено, что активность гексозаминидаз А и В возрастала до терапевтически необходимого уровня (для гексозаминидазы А – до 15 % от нормы для мозга и до 40 % для печени), и этот уровень сохранялся повышенным в течение 2–24 мес. Лечение способствовало устранению накопления ганглиозидов в мозге (2–4 мес.), в том числе в значительной мере – в мозжечке. Подавлялась гибель нейронов, астроцитов, микроглии. Таким образом, лечение неонатальных мышей с помощью внутривенного введения вектора AAV9-HexB дает хорошие результаты [29].

Подобный подход применен и в отношении мукополисахаридоза MPS IIIС, сопровождающегося поражением ЦНС. Ставили задачу доставки недостающего фермента (HSGNAT) в мозг, прохождение ГЭБ (постер С. O'Leary, Англия). Для этого использовали систему AAV и интракраниальное введение препарата, потенциально способные восстановить активность фермента в мозге и корректировать неврологические нарушения. В эксперимент взяли мышиную модель заболевания. Введение конструкции AAV- HSGNAT в стриатум мозга повышало уровень фермента выше нормы дикого типа, особенно выражено в

точке инъекции и в ближних сечениях R2 и R3 (свыше 300 %) [24]. Таким образом, в определенной мере подготовлено обоснование терапевтических интервенций в мозг пациентов с MPS IIIС.

В последнее время специалисты считают, что ЗЭТ является слишком дорогим лечением, она эффективна при ограниченном круге ЛБН, и поэтому активно исследуются другие подходы. Найдено, что однократное введение низких количеств аденоассоциированного вектора с серотипом 8 (AAV2/8) мышам с MPS VI так же эффективно, как ЗЭТ ферментом в течение недели (постер R. Ferla, Италия). При этом введение больших доз конструкции, являющееся дорогостоящим лечением, может приводить к нежелательным иммунным реакциям, поэтому применили комбинацию низких доз генотерапии и редких инъекций ЗЭТ (ежемесячно). Совместная терапия приводила к снижению содержания гликозаминогликанов в моче, подавлению лизосомного накопления в миокарде и была так же эффективна, как высокие дозы генной терапии или обычная еженедельная ЗЭТ [11]. Таким образом, уменьшение доз данных терапевтических воздействий повышает безопасность и снижает риски и стоимость лечения.

Предлагается проверять эффективность лечения ЛБН предварительно на изолированных клетках пациента. Так, для болезни Фабри (дефект α -галактозидазы А) получили генотрансформированные клетки, содержащие разные мутации гена фермента от 6 разных пациентов, и испытали действие химического шаперона DGJ (постер L. Ferri, Италия). У всех линий клеток была снижена активность α -галактозидазы, а позитивный эффект терапии обнаружен только для двух вариантов клеток из шести [12]. Таким образом, функциональное тестирование лечения на клеточных культурах является полезным подходом для прогноза эффективности лечения.

Интересные данные получены при изучении муколипидоза II (ML II, I-cell disease), характеризующегося «утечкой» из клеток многих лизосомных ферментов в результате дефекта рецептора маннозо-6-фосфата (M-6-P) и накоплением недеградируемого материала (постер S. Krambeck, Германия). Ключевым ферментом синтеза рецептора является фермент глюкозо-N-ацетил-фосфотрансфераза. Несмотря на этот дефект, в гепатоцитах и клетках Купфера печени, в лейкоцитах крови активность лизосомных ферментов практически не менялась. В связи с этим исследовали замещающие пути внутриклеточного транспорта лизосомных ферментов. В гомогенате печени нашли высокую активность идуонат-2-сульфатазы, α -фукозидазы при отсутствии изменений активности α -L-идуонидазы и

β -глюкуронидазы. А с помощью вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции нашли дополнительный эффективный М-6-Р-независимый транспорт в лизосомы катепсинов В, D, Z. На изолированных гепатоцитах показали, что достаточно хорошо достигают лизосом катепсины В, D, Z, нейраминидаза I. Страдал транспорт холестерин-связывающего белка Npc2, однако это не приводило к накоплению неэтерифицированного холестерина в лизосомах. Эндоцитоз М-6-Р-содержащей арилсульфатазы В слабо повышался. В целом, в отличие от фибробластов пациентов с МЛП, в гепатоцитах существенно не изменялись ни экспрессия, ни распределение рецепторов М-6-Р, ни активность лизосомных ферментов. И даже активность аутофагии, оцениваемой по маркеру LC3-II, не была снижена. Таким образом, гепатоциты снабжены активным М-6-Р-независимым механизмом транспорта лизосомных ферментов для обеспечения лизосомного и клеточного гомеостаза в печени [20].

Предпринимаются попытки получения удобных маркеров для слежения за прогрессированием и эффективностью терапии лизосомных болезней, в частности болезни Помпе (постер G. Parenti, Италия). Используя технологию NGS, исследовали тканеспецифичные микроРНК, локализующиеся в сердце и мышцах или циркулирующие в крови животных с анимальной моделью заболевания. Нашли большой спектр тканеспецифичных микроРНК, экспрессирующихся на разные сроки заболевания (3 и 9 месяцев), и 42 их вида были общими на оба срока. В плазме крови больных обнаружили отличия у 7 пациентов с инфантильной формой болезни Фабри и у 10 пациентов с поздней формой [33]. В целом, предлагается клиническое использование этого диагностического подхода, отражающего тяжесть течения болезни Фабри.

На мышинной модели MPS II разрабатывается доставка в мозг недостающего фермента идуронат-2-сульфатазы посредством новых носителей – полимерных наночастиц с прикрепленным адресованным в мозг пептидом g7 (постер L. Rigon, Италия). Показано прохождение частицами ГЭБ и повышение эффективности доставки фермента, правда, нуждающейся в ускорении его освобождения из частиц [27].

Терапия ЛБН субстратной депривацией может осуществляться с помощью мелких интерферирующих РНК (siRNA), способных подавлять экспрессию целевых генов. На примере мукополисахаридоза MPS IIIС (дефект ацетил-СоА-глюкозаминид-N-ацетил-трансферазы) применили siRNA генов *EXTL2* и *EXTL3*, кодирующих синтез гепарансульфата, накапливающегося при

данном заболевании (постер L. Vilageliu, Испания). На фибробластах двух пациентов нашли, что 4 вида таких РНК на 90 % подавляли синтез мРНК соответствующих генов и наработку гликозаминогликанов (на 30-60 %, через 3 дня) и их накопление (до 24 %, через 14 дней) [6]. А с помощью иммуноцитохимии показали признаки терапевтической нормализации фенотипа. Таким образом, данный подход перспективен в лечении синдрома Санфилиппо С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди представленных направлений исследований наиболее актуальными являются активация неспецифической клеточной защиты от стресса и дегенерации, и в первую очередь в процессах нейродегенерации, обусловленной ЛБН. Поскольку активность аутофагии снижается с возрастом и при клеточной интоксикации, вызываемой ЛБН, становится важным стимулировать аутофагию для очищения клетки от патогенных продуктов и восстановления функциональной активности [5]. В отношении нейродегенерации аутофагия выполняет функции удаления патогенных белков α -синуклеина, тау-белков, хантингтина, накапливающихся при ЛБН и одновременно способствующих формированию болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона соответственно. Установлены некоторые общие механизмы дегенерации нейронов при болезнях Гоше и БП, состоящие в стрессе ЭПР, индуцируемом дефектом β -глюкоцереброзидазы при болезни Гоше, приводящем к накоплению α -синуклеина и гибели дофаминовых нейронов, угнетению функций мозга и симптомам БП.

Существенная роль в обеспечении клеточного гомеостаза отводится контролю и поддержанию стабильности лизосом, предотвращению их пермеабиллизации как проапоптогенного фактора и освобождения катепсинов В и D. Другими факторами усиления клеточной защиты при ЛБН и нейродегенерации могут быть шаперон Hsp70, регулятор биогенеза лизосом и аутофагии TFEB, активация процессов слияния везикул с помощью белка SNARE и др.

Получены первые данные о том, что активация аутофагии может влиять не только на торможение нейродегенерации, но и на исправление дефектов скелета, вызываемых ЛБН. Новым подходом является оценка экспрессии широкого спектра белков, связанных с аутофагией, посредством мощной аналитической системы Лизоплекс.

Существенный прогресс достигнут в области генной терапии ЛБН с использованием лентивирус- и аденовирусассоциированных векторов

для доставки генов промоторов и недостающих ферментов в дефектные клетки. Нередко для исправления симптомов нейропатологии достаточно внутривенного введения таких генетических конструкций, однако в других случаях повышение эффективности достигается интракраниальным введением препаратов, как правило, в желудочки мозга или стриатум. Такие исследования обеспечивают базу для клинического испытания технологий интракраниальной генной терапии ЛБН.

Приведенные результаты свидетельствуют об усилении диагностической ценности исследования материала СМЖ, отражающего патологию головного мозга. Разрабатывается терапевтический подход, связанный с тестированием эффективности лечения на клеточных культурах, полученных от пациентов с ЛБН.

Представленные тенденции исследования и лечения ЛБН выделяют пути повышения эффективности научного поиска в этой области. Вместе с тем изучаются и возможности оптимизации и удешевления лечения лизосомных болезней, поскольку часто высокая стоимость лекарств является тормозом для проведения терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-01423.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aits S., Jäättelä M., Nylandsted J. Methods for the quantification of lysosomal membrane permeabilization: a hallmark of lysosomal cell death // *Methods Cell Biol.* 2015. 126. 261–285.
2. Ballabio A., Naldini L. Fighting rare diseases: the model of the telethon research institutes in Italy // *Hum. Gene Ther.* 2015. 26. (4). 183–185.
3. Bartolomeo R., Salzano A.C., Settembre C. Identification of molecular targets for the treatment of the skeletal phenotype in Lysosomal Storage Disorders // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 26.
4. Blomqvist M., Lindgren J., Olsson L. et al. Validation of an NGS-panel for routine diagnosis of lysosomal and peroxisomal disorders // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 61.
5. Brandenstain L., Schweizer M., Sedlacik J. et al. Lysosomal dysfunction and impaired autophagy in a novel mouse model deficient for the lysosomal membrane protein Cln7 2015 // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 27.
6. Canals I., Beneto N., Cozar M. et al. EXTL2 and EXTL3 inhibition with siRNA as a promising substrate

reduction therapy for Sanfilippo C syndrome // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 127.

7. Ceccarini M.R., Paciotti S., Tasegian A. et al. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes in Parkinson disease // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 65.

8. Cox T.M. Innovative treatments for lysosomal diseases // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. 29. (2). 275–311.

9. DiFruscio G., Schulz A., De Cegli R. et al. Lysoplex: An efficient toolkit to detect DNA sequence variations in the autophagy-lysosomal pathway // *Autophagy.* 2015. 11. (6). 928–938.

10. Ellison S., Sergijenko A., Langford-Smith A. et al. Pre-clinical workup of lentiviral mediated stem cell gene therapy for Mucopolysaccharidosis type IIIA // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 77.

11. Ferla R., Alliegro M.L., Nusco E. et al. Combination of low-dose gene therapy and monthly enzyme replacement therapy improves the phenotype of a mouse model of lysosomal storage disease // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 79.

12. Ferri L., Malesci D., Filippini A. et al. The challenge of significance of new GLA gene variations: the importance of functional studies Course. Naples, 2015 // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 80.

13. Gleitz H., O'Leavy C., Holley R., Bigger B. Development of a lentiviral-based gene therapy for Mucopolysaccharidosis II // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 83.

14. Gonzales A., Jagdmann S., Saftig P., Damme M. Pld3 – A new lysosomal protein implicated in Alzheimer's disease // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 30.

15. Jäättelä M., Nylandsted J. Methods for probing lysosomal membrane permeabilization // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015. (11). 975–978.

16. Kirkegaard T., Gray J., Priestman D.A. et al. Development of Heat Shock Protein based therapies for Lysosomal Storage Diseases // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 89.

17. Kirkegaard T., Gray J., Petersen N.H.T. et al. Hsp70-based therapies as clinical candidates for lysosomal storage diseases // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 81.

18. Klumperman J., Jobling R., ten Brink C. et al. Mutations of Vps41, encoding a regulator of lysosomal fusion events, cause a Parkinson-like phenotype and reduction in cellular LAMP levels // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 36.

19. Korolenko T.A., Johnson T., Goncharova N.V., Pisareva E.E., Filjushina E.E., Chrapova M.V. Intracellular lipid storage syndrome (lipidosis) following prolonged treatment of Poloxamer 407 in mice // 20th

ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 90.

20. *Krambeck S., Markmann S., Damme M., Braulke T.* Mannose-6-phosphate-independent transport of lysosomal enzymes in liver cells // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 91.

21. *Maor G., Zalesca O., Segal D., Horowitz M.* The contribution of mutant Gba alleles to the development of Parkinson's disease in carriers of Gaucher disease mutations // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 33.

22. *Mitchell N.L., Wicky H.E., Schoderbock L. et al.* Viral-mediated gene therapy prevents disease development in avine models of neuronal ceroid lipofuscinosis // 20th ESGLD Workshop and Grad. Course. Naples, 2015. 42.

23. *Nelvagal H.R., Dmytrus J., Dearbon J. et al.* Defining spinal cord neuropathology in a mouse of Infantile Neuronal CeroidLipofuscinosis (INCL) and accessing the efficacy of intrathecal Enzyme Replacement Therapy (ERT) // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 29.

24. *O'Leary C., Antunes A.S.L., Parker H. et al.* Development of an adeno-associated viral mediated gene therapy approach for Mucopolysaccharidosis IIIC // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 107.

25. *Pupyshv A.B., Korolenko T.A., Tikhonova M.A.* Osmotic behavior of lysosomes as an index of autophagy in cellular lipid overloading and experimental treatment of early senescence // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 112.

26. *Raimo S., Tsuji D., Spanpanato C. et al.* A physiological role of TFEB in LSDs // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 48.

27. *Rigon L., Salvalaio M., Pederzoli F. et al.* Enzyme-loaded nanoparticles: a potential therapy for the neurological compartment in Mucopolysaccharidosis type II // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 113.

28. *Ron I., Rapaport D., Horowitz M.* Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease // *Hum. Mol. Genet.* 2010. 19. (19). 3771–3781.

29. *Rouviere L., Niemir N., Besse A. et al.* Intravenous AAV9-mediated gene transfer prevents pathology in neonatal Sandhoff mice // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 114.

30. *Rubinsztein D.C., Bento C.F., Deretic V.* Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases // *J. Exp. Med.* 2015. 212. (7). 979–990.

31. *Sambri I., D'Alessio R., Ezhova Y. et al.* Lysosomal dysfunction disrupts presynaptic maintenance in neurodegenerative diseases through a α -synuclein and CSP α -dependent pathway// 20th ESGLD Workshop and Graduated Co Course. Naples, 2015. 49.

32. *Tasegian A., Paciotti S., Ceccarini M.R. et al.* Origin of α -mannosidase in cerebrospinal fluid // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 121.

33. *Tarallo A., Gatto F., Karali M. et al.* Analysis of circulating and tissue-specific microRNAs in Pompe disease // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course. Naples, 2015. 110.

34. *Von Figura K.* Structure-function relationship for lysosomal enzymes // *Acta Paediatr.* 2007. 96. (455). 5.

LYSOSOMAL STORAGE DISEASES IN EUROPE: PROBLEM OF NEURODEGENERATION AND THE NEW TRENDS IN THERAPEUTIC INTERVENTIONS

Alexandr Borisovich PUPYSHEV

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

*Institute of Physiology and Basic Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4*

The new tendencies in study of lysosomal storage diseases in Europe with a special interest in autophagy, neuropathology and the new therapeutic technologies were considered. Decrease of autophagy contributes usually to accumulation of misfolded proteins, stress of ER (UPR), protein aggregation and formation of neuropathological signs. This is shown for influence of Gaucher disease (defect of β -glucocerebrosidase) on formation of Parkinson disease. Storage syndrome as whole and cellular senescence hinder activity of autophagy and endocytosis. Therefore therapeutic/neuroprotective interventions for treatment of lysosomal diseases were connected with stimulation of the own cellular protective mechanisms such as autophagy, activity of proteins TFEB, Hsp70. Additionally to neuroprotection the positive effect of enhanced autophagy on prevention of bone defects was shown also. Considerable progress was achieved in gene therapy of lysosomal diseases by application of adenovirus- and lentivirus-associated constructions of wild type of defective enzymes or their promoters, and the best results were obtained with intracranial mode of injection. The other ways of successful therapeutic interventions were considered also.

Key words: lysosomes, lysosomal storage diseases, neurodegeneration, autophagy, enzyme-replacement therapy, gene therapy.

*Pupyshev A.B. – candidate of biological sciences, senior researcher of central research laboratory,
e-mail: apupyshev@mail.ru*

ПРЕВЕНТИВНОЕ ВНУТРИВЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ ЗИМОЗАН-ОБРАБОТАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ ПОДАВЛЯЕТ РОСТ МЕЛАНОМЫ В16 В ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКЕ МЫШЕЙ

Геннадий Юрьевич ЛЮБИМОВ¹, Андрей Геннадьевич ЛЮБИМОВ¹,
Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА², Владимир Александрович КОЗЛОВ¹

¹ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

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

Исследовалось действие нейтрофилов, активированных *ex vivo* зимозаном и введенных в хвостовую вену, на рост меланомы В16 в печени и селезенке мышей. Проведенные эксперименты позволили установить, что внутривенная инъекция обработанных зимозаном нейтрофилов за 3 дня до инокуляции суспензии клеток меланомы В16 приводит к достоверному снижению количества опухолевых узелков в печени ($33,8 \pm 10,9$ до 0) и прироста массы пораженной печени (612 ± 136 до 0 мг) на 21 день опухолевого роста. Кроме того, произошло достоверное уменьшение количества опухолевых узелков в селезенке ($4,7 \pm 0,6$ до 0). Полученные результаты выявили полное подавление роста меланомы В16 в печени и селезенке мышей в результате воздействия активированных *ex vivo* зимозаном нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, макрофаги, зимозан, глюкан, печень, селезенка, меланома.

Активирующее действие зимозана на иммунокомпетентные клетки более 50 лет находится под пристальным вниманием ученых. Однако микрокастичковая природа зимозана, а также свойство составляющих его молекул глюкана активировать фагоциты и систему комплемента приводит к череде побочных эффектов и тяжелых осложнений [12, 13, 16], что препятствует применению зимозана в медицинской практике. Также известно, что фактически любая микрокастица, попавшая в организм, захватывается фагоцитирующими клетками [2, 6]. В связи с этим возникла идея – изначально, в условиях *ex vivo*, инкорпорировать частицы зимозана в фагоциты, а затем вводить их в организм животного или человека.

Ранее нами показано, что макрофаги, обработанные зимозаном в условиях *in vitro* и в последующем введенные в портальную вену, проявляют противоопухолевое действие, подавляя рост меланомы В16 в печени мышей [1]. Если в даль-

нейшем пытаться внедрять этот экспериментальный метод в лечебной практике, то процедура использования макрофагов, получаемых из моноцитов крови человека, окажется дорогостоящей и трудоемкой [5]. В связи с этим целесообразно проведение аналогичной серии экспериментов с использованием нейтрофилов, так как методика их получения менее затратна и, согласно данным некоторых исследователей, наряду с макрофагами нейтрофилы способны принимать участие в противоопухолевой защите организма [8–10, 14]. Кроме того, очевидно, что метод внутривенного введения клеток инвазивен и технически сложен, к тому же сама процедура вызывает у пациентов чувство страха и эмоционального дискомфорта.

Вышесказанное определило цель настоящего исследования – изучить эффект внутривенного (через хвостовую вену) введения мышам зимозан-обработанных нейтрофилов на рост меланомы В16.

Любимов Г.Ю. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории регуляции иммунопоэза,
e-mail: glubimov@rambler.ru

Любимов А.Г. – младший научный сотрудник лаборатории регуляции иммунопоэза,
e-mail: glubimov@rambler.ru

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

Козлов В.А. – д.м.н., проф., академик РАН, зав. лабораторией клинической иммунопатологии,
e-mail: niiki01@online.nsk.su

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали 30 самок мышей (СВА × С57BL/6)F1 в возрасте 6–8 мес., массой 32–38 г, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (г. Новосибирск). Уход за экспериментальными животными и их содержание в условиях вивария были стандартными и соответствовали требованиям приказов «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» № 1045-73 от 06.04.1973, а также № 1179 от 10.10.1983 МЗ СССР, № 267 от 19.06.2003 МЗ РФ, «Правилам по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденным МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

Мыши были разделены на 3 группы: животным группы интактного контроля ($n = 5$) в хвостовую вену вводили 0,5 мл натрий-фосфатного буфера (PBS), животным группы позитивного контроля ($n = 5$) – 0,5 мл PBS и клетки меланомы B16, животным группы опыта ($n = 5$) – нейтрофилы, инкубированные в присутствии зимозана, в 0,5 мл PBS и клетки меланомы B16 (см. ниже). Эксперимент повторяли дважды.

Зимозан (Биохимреактив, Латвия) гомогенизировали тefлоновым пестиком при 2000 об/мин в течение 90 с (допустимый размер гранул 1–5 мкм) и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин в неактивированной сыворотке мышей. Затем гранулы зимозана трижды отмывали в 10 мл натрий-фосфатного буфера (PBS) при 3000 об/мин.

За 3 часа до выделения нейтрофилов мышам внутрибрюшинно вводили 1 мл 10%-го раствора пептона (Difco, США). Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Для получения клеток в брюшную полость вводили 10 мл холодного PBS, брюшко массируют в течение 60 с, затем шприцем извлекали ранее введенный раствор. Содержание нейтрофилов в полученной таким образом суспензии клеток составляло 98 %, что подтверждено светооптическим исследованием приготовленных из нее мазков, окрашенных по Романовскому – Гимзе.

В пластиковом флаконе для культивирования с площадью 25 см² создавали монослой нейтрофилов плотностью 1×10^6 /см², заливали 10 мл культуральной среды RPMI-1640 с 10 % инактивированной сыворотки мышей и 2 мг/мл зимоза-

на. Фагоцитоз проводили в течение 40 мин в термостате при 37 °С.

После фагоцитоза пластиковый флакон трижды отмывали от непоглощенных гранул зимозана 20 мл PBS, монослой клеток открепляли от поверхности флакона резиновым скрепером и доводили до концентрации 30×10^6 /мл холодным PBS. Полученную суспензию клеток вводили в хвостовую вену в объеме 0,5 мл (таким образом, количество введенных нейтрофилов составляло 15×10^6 на мышь) за 3 дня до инъекции клеток меланомы B16.

С целью образования печеночных очагов роста опухоли 10 000 клеток меланомы B16 (получены из банка опухолевых линий Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена) вводили в портальную вену. На 21-й день после инъекции опухолевых клеток животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации, проводили эвисцерацию печени и селезенки. Определяли массу печени, селезенки и подсчитывали в них число поверхностно расположенных опухолевых узелков. Массу опухоли определяли как разницу между массой печени животных группы позитивного контроля и группы интактного контроля, группы опыта и группы интактного контроля.

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 критерия Манна–Уитни, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в ходе настоящего исследования данные оказались аналогичными и более показательными по сравнению с результатами опытов, в которых мы использовали макрофаги [1], поскольку введение зимозан-активированных нейтрофилов приводило к практически полной отмене опухолевого роста, что наглядно представлено на цифровом снимке (см. рисунок) и подтверждается табличными данными (см. таблицу). Так, если количество опухолевых узелков в печени мышей группы позитивного контроля (получавших инъекцию неактивированных нейтрофилов) составляло $33,8 \pm 10,9$, в селезенке – $4,7 \pm 0,6$, то у мышей группы опыта, которым вводили зимозан-активированные нейтрофилы, оба показателя равнялись 0. Аналогичным образом уменьшилась и масса опухоли в обоих исследованных органах. Такое выраженное действие зимозан-активированных нейтрофилов на

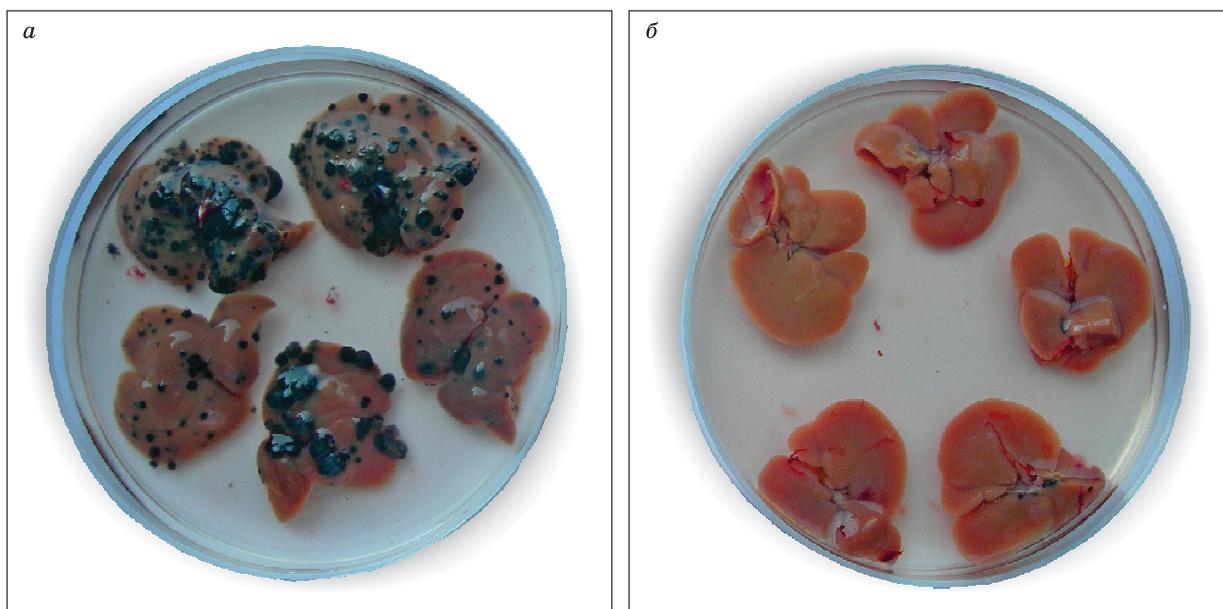


Рис. Внешний вид печени мышей линии (СВА × С 57В1/6) F1 на 21-й день после инокуляции клеток меланомы В16; за 3 дня до инъекции опухолевых клеток животным в хвостовую вену вводили PBS (а) либо суспензию аутологичных зимозан-активированных нейтрофилов (б)

Таблица

Влияние введенных внутривенно зимозан-обработанных нейтрофилов на параметры роста меланомы В16 мышей линии (СВА × С 57В1/6) F1

Параметр	Позитивный контроль	Опыт	Интактный контроль
Масса опухоли в печени, мг	612 ± 136 [#]	0*	0
Масса опухоли в селезенке, мг	29,6 ± 25,3 [#]	0*	0
Количество узелков опухоли в печени	33,8 ± 10,9 [#]	0*	0
Количество узелков опухоли в селезенке	4,7 ± 0,6 [#]	0*	0
Масса печени, мг	2218 ± 257 [#]	1697 ± 63	1606 ± 59
Масса селезенки, мг	166 ± 25	184 ± 16 [#]	136 ± 22

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,001$) отличия от величин соответствующих показателей группы позитивного (*) и интактного (#) контроля.

опухолевый рост, вероятно, объясняется тем, что если макрофаги вводились одновременно с опухолевыми клетками, то нейтрофилы – за три дня до инокуляции опухоли, что, возможно, привело к мобилизации клеточного противоопухолевого потенциала печени [7]. В пользу этого говорит наличие статистически недостоверной гиперплазии печени (определяемой по массе органа) и статистически значимого увеличения массы селезенки (см. таблицу), что является следствием стимуляции лейко- и гемопоэза зимозаном [3, 4]. Отсутствие выраженного прироста массы печени объясняется тем, что основной пик ее гиперплазии приходится примерно на 9-й день от момента внутривенного введения суспензии зимозана, затем гиперплазия начинает медленно инволюционировать и примерно к 20–25 дню раз-

меры печени возвращаются к исходному уровню [3, 4], в настоящем же исследовании мы проводили измерение массы органов на 24 день после введения зимозан-активированных нейтрофилов.

В отдельной серии экспериментов по выяснению действия интактных нейтрофилов (элицированных в брюшную полость 10%-м раствором пептона и необработанных зимозаном) на опухолевый рост мы не обнаружили какого-либо их влияния на рост меланомы В16 в печени и селезенке мышей. Количество опухолевых узелков в печени животных группы позитивного контроля и у мышей, которым вводили нестимулированные нейтрофилы, составило соответственно $43,8 \pm 17,5$ и $51,0 \pm 19,8$. Аналогичные результаты получены при подсчете числа опухолевых узелков в селезенках ($9,8 \pm 4,3$ и $10,5 \pm 4,2$ соот-

ветственно). Более того, полученные данные указывают на наличие недостоверной стимуляции роста опухоли в печени и селезенке, что согласуется с данными других авторов [11, 15].

Таким образом, введение зимозан-активированных нейтрофилов в венозную систему большого круга кровообращения за несколько дней до инокуляции меланомы В16 приводит к полной отмене роста опухоли в печени и селезенке, очевидно, в результате значительной активации цитотоксических свойств иммунокомпетентных клеток данных органов. Это может происходить либо за счет увеличения притока в печень и селезенку соответствующих предшественников, либо за счет активации уже имеющихся в них резидентных пулов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование влияния нагруженных зимозаном нейтрофилов на рост меланомы В16 в печени и селезенке мышей выявило полное подавление злокачественного роста меланомы В16. Столь выраженное угнетение объясняется тем, что активированные нейтрофилы вводились превентивно, за несколько дней до инокуляции опухоли, что позволяет увеличить потенциал неспецифической противоопухолевой активности печени и селезенки. Это дает основание для дальнейшей разработки возможности применения таких нейтрофилов в профилактике и лечении метастазов печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Любимов Г.Ю., Любимов А.Г. Влияние инкорпорированного в аутологичные макрофаги зимозана на метастатический рост меланомы В16 в печени мышей // Рос. иммунол. журн. 2011. 5. (3–4). 309–314.
2. Маянский Д.Н., Щербаков В.И., Правоторов Г.В. Растворимые системы мононуклеарных фагоцитов микробными стимуляторами // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1983. (4). 52–55.
3. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д. Реактивность макрофагов легких и печени нормальных и предварительно стимулированных животных // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1989. (4). 44–48.
4. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Йонкер А.М. и др. Индукция гранулематозного воспаления печени неинфекционными частицами // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1990. (5). 45–49.
5. Andreesen R., Scheibenbogen C., Brugger W. et al. Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated *in vitro* from circulating blood monocytes: a new approach to cancer immunotherapy // Cancer Res. 1990. 50. (23). 7450–7456.
6. Benaceraff B., Biozzi G., Halpern B., Stiffel C. Physiology and phagocytosis of particles by R. E. S. // Physiopathology of the Reticuloendothelial Cells / Ed. B.N. Halpern. Oxford: Blackwell, 1957. 52–59.
7. Bouwens L., Wisse E. Tissue localization and kinetics of pit cells or large granule lymphocytes in the liver of rats treated with biological response modifiers // Hepatology. 1988. 8. (1). 46–52.
8. Fisher B., Saffer E.A. Tumor cells cytotoxicity by granulocytes from peripheral blood of tumor-bearing mice // J. Natl. Cancer Inst. 1978. 60. (3). 687–691.
9. Gerrard T.L., Cohen D.J., Kaplan A.M. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells // J. Natl. Cancer Inst. 1981. 66. (3). 483–488.
10. Morikawa K., Takeda R., Yamazaki M., Mizuno D. Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear beta-1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells // Cancer Res. 1985. 45. (4). 1496–1501.
11. Pekarek L.A., Starr B.A., Toledano A.Y., Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes // J. Exp. Med. 1995. 181. (1). 435–440.
12. Schirmer W.J., Schirmer J.M., Naff G.B., Fry D.E. Contribution of toxic oxygen intermediates to complement-induced reductions in effective hepatic blood flow // J. Trauma. 1988. 28. (9). 1295–1300.
13. Schirmer W.J., Schirmer J.M., Naff G.B., Fry D.E. Systemic complement activation produces hemodynamic changes characteristic of sepsis // Arch. Surg. 1988. 123. (3). 316–321.
14. Sionov R.V., Zvi G., Fridlender Z.G., Granot Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment // Cancer Microenviron. 2015. 8. 125–158.
15. Smith H.A., Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells // J. Mol. Med. 2013. 91. (4). 411–429.
16. Volman T.J., Hendriks T., Goris R.J. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome // Shock. 2005. 23. (4). 291–297.

PREVENTIVE INTRAVENOUS INJECTION OF ZYMOSAN-TREATED NEUTROPHILS SUPPRESSES GROWTH OF B16 MELANOMA IN MICE LIVER AND SPLEEN

**Gennady Yur'evich LYUBIMOV¹, Andrey Gennadievich LYUBIMOV¹,
Elena Bronislavovna Menshchikova², Vladimir Aleksandrovich KOZLOV¹**

¹ *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14*

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

We investigated the effect of activated ex vivo with zymosan and injected into tail vein neutrophils on the growth of B16 melanoma in mice liver and spleen. Our experiments showed that intravenous injection of zymosan-treated neutrophils 3 days before inoculation of B16 melanoma cell suspension results in a significant decrease of tumor nodule number in the liver (from 33.8 ± 10.9 to 0) and the weight gain of affected liver (from 612 ± 136 to 0 mg). The number of tumor nodules in the spleen dramatically decreased too (from 4.7 ± 0.6 to 0). The results indicate that intravenous injection of zymosan-treated neutrophils leads to a total suppression of B16 melanoma growth in mice liver and spleen.

Key words: neutrophil, macrophage, zymosan, glucan, liver, spleen, melanoma.

*Lyubimov G.Yu. – candidate of medical sciences, researcher, laboratory of immunopoiesis regulation,
e-mail: glubimov@rambler.ru*

Lyubimov A.G. – junior researcher, laboratory of immunopoiesis regulation, e-mail: glubimov@rambler.ru

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

*Kozlov V.A. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, head of the laboratory of clinical
immunopathology, e-mail: niiki01@online.nsk.su*

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ САЛЬПИНГООФОРИТОМ И БЕСПЛОДИЕМ

Лилия Алексеевна ТРУНОВА¹, Игорь Олегович МАРИНКИН²,
Александр Николаевич ТРУНОВ^{1,2}, Виталий Михайлович КУЛЕШОВ²,
Ольга Олеговна ОБУХОВА¹, Ольга Михайловна ГОРБЕНКО¹, Аля Петровна ШВАЮК¹

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

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

Целью настоящего исследования было изучение содержания некоторых цитокинов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости женщин с бесплодием на фоне хронического воспалительного заболевания органов малого таза (ХВЗОМТ). Обследовано 50 пациенток с установленным диагнозом бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне ХВЗОМТ в стадии клинической ремиссии и 15 женщин аналогичного возраста. У пациенток обследованных групп в сыворотке крови и перитонеальной жидкости проведено определение концентраций ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-6, ИНФ- γ , моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) и растворимой молекулы межклеточной адгезии sVCAM-1. Установлено, что в патогенезе бесплодия, возникшего на фоне ХВЗОМТ, значимую роль играет сохранение активности местного воспалительного процесса и активация иммунного реагирования в период клинической ремиссии патологического процесса. Указанное подтверждается повышением в сыворотке крови и перитонеальной жидкости концентраций цитокинов, обладающих провоспалительной активностью (ИЛ-6, MCP-1, sVCAM-1), и индукторов, способных активировать иммунное реагирование по Th1- (ИНФ- γ) и Th2-пути (ИЛ-4). Отличием в содержании цитокинов в исследованных биологических жидкостях являются нормативные значения концентраций ФНО- α в сыворотке крови пациенток основной группы. Результаты исследования свидетельствуют о роли хронического воспаления репродуктивной сферы и вызванного им дисбаланса цитокинов в механизмах развития бесплодия трубно-перитонеального генеза.

Ключевые слова: цитокины, хроническое воспаление, бесплодие, иммунное реагирование.

Не вызывает сомнения, что широкая распространенность женского бесплодия является одной из самых актуальных и социально значимых проблем в современном акушерстве и гинекологии. В настоящее время, несмотря на значительные успехи в развитии новых медицинских технологий, направленных на совершенствование диагностики и лечения патологии женской репродуктивной сферы, приходится констатировать как отсутствие тенденции к снижению частоты встречаемости женского бесплодия различной

этиологии, так и неудовлетворенность врачей практического здравоохранения результатами лечения [10, 15, 19, 22, 23].

Данные научной литературы, а также анализ результатов собственных исследований позволяют сделать заключение, что, зачастую, в патогенезе женского бесплодия и многих других нарушений процессов гестации лежит высокая распространенность инфекционно-воспалительных заболеваний органов репродуктивной сферы у женщин [7–9, 12, 20, 21].

Трунова Л.А. – д.м.н., проф., член-кор. РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии
Маринкин И.О. – д.м.н., проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии, e-mail: rectorngmu@yandex.ru
Трунов А.Н. – д.м.н., проф., рук. лаборатории иммунологии репродукции, e-mail: trunov1963@yandex.ru
Кулешов В.М. – д.м.н., проф., проф. кафедры акушерства и гинекологии, e-mail: kuleshov_vm@mail.ru
Обухова О.О. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии, e-mail: olga.o.obukhova@gmail.com
Горбенко О.М. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, e-mail: gorbenko1956@yandex.ru
Шваюк А.П. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, e-mail: alevtina.shvayuk@yandex.ru

В научной литературе имеется достаточно большой массив информации о нарушениях функционального состояния иммунной системы, включая данные об изменении содержания и дисбалансе различных классов цитокинов, являющихся регуляторами межклеточных взаимоотношений, в механизмах развития острых и обострений хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (ХВЗОМТ) у женщин. Кроме того, существуют данные о том, что дисбаланс продукции цитокинов и факторов роста различной функциональной направленности влияет на синтез половых гормонов, играющих значимую роль в процессах репродукции. Показано, что длительный дисбаланс цитокинов с нарастанием синтеза провоспалительных интерлейкинов приводит к нарушениям иммуноэндокринной регуляции и возникновению бесплодия [1, 3–6, 11, 14, 15, 18].

В то же время в период зачатия воспалительные заболевания репродуктивной сферы основной части женщин находятся в стадии клинической ремиссии, и они в этот период не предъявляют жалоб и не обращаются за медицинской помощью. Указанное приводит к тому, что данные об активности воспаления в этой стадии, во многом определяющей дальнейшее развитие заболевания и его исходы, представлены единичными работами и требуют углубленного изучения для понимания их роли в механизмах развития бесплодия [6, 7, 20].

Значимым для понимания механизмов развития местного процесса воспаления представляется изучение изменений содержания различных биологически активных молекул не только в системном кровотоке, но и в других биологических жидкостях, имеющих непосредственный контакт с очагом воспаления.

Вышеизложенное определяет актуальность и научно-практическую значимость исследований, посвященных углубленному изучению возможной роли активности воспалительного процесса в механизмах развития бесплодия у женщин репродуктивного возраста.

Цель исследования – изучить особенности содержания некоторых цитокинов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости женщин с бесплодием на фоне ХВЗОМТ в стадии клинической ремиссии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с целью исследования на базе ГБУЗ НСО «Центр планирования семьи и репродукции» г. Новосибирска за период с 2013 по 2015 г. было обследовано 65 женщин репро-

дуктивного возраста. Все женщины дали информированное согласие на участие в исследовании, которое соответствовало этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией. Кроме того, было получено согласие этического комитета НИИ экспериментальной и клинической медицины на проведение исследования, протокол № 23 от 9 ноября 2012 г.

Основную группу составили 50 пациенток в возрасте 23–36 лет (средний возраст – 28,5 года) с верифицированным диагнозом бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы в стадии клинической ремиссии. Длительность бесплодия в группе составила от 4 до 13 лет (в среднем 9,7 года). Критерием включения в исследование являлось наличие диагноза бесплодия трубно-перитонеального генеза и хронического заболевания органов малого таза инфекционно-воспалительного генеза в стадии ремиссии, а также отсутствие субъективных жалоб, повышения температуры тела и нормативные значения показателей периферической крови (содержание лейкоцитов, лейкоцитарная формула, уровень СОЭ). У пациенток основной группы был проведен забор венозной крови и, во время плановой хирургической лапароскопии с целью коррекции причин бесплодия, забор перитонеальной жидкости.

Группу сравнения составили 15 женщин в возрасте 25–37 лет (средний возраст 29,5 года). Критерием включения в контрольную группу было отсутствие у пациенток в анамнезе хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов малого таза, признаков хронических воспалительных заболеваний придатков матки при лапароскопии, а также отсутствие субъективных жалоб, повышения температуры тела и нормативные значения показателей периферической крови (содержание лейкоцитов, лейкоцитарная формула, СОЭ). У пациенток группы сравнения был проведен забор венозной крови и, во время диагностической лапароскопии с целью исключения женского фактора бесплодия, забор перитонеальной жидкости.

Критерием включения для обеих групп являлось отсутствие в течение трех месяцев до обследования острых и обострений хронических воспалительных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии любой локализации, критерием исключения – наличие эндокринных нарушений, способных влиять на синтез половых гормонов и оказывать влияние на функциональное состояние иммунной системы, а также аутоиммунных и злокачественных опухолевых процессов любой локализации.

Определение концентраций тестируемых биологически активных молекул в сыворотке крови и перитонеальной жидкости выполняли с использованием коммерческих тест-систем для иммуноферментного анализа по инструкции производителя, при исследовании содержания моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) применяли тест-системы производства «Вектор-Бест» (Россия), ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-6, ИНФ- γ – ООО «Цитокин» (Россия), растворимой молекулы межклеточной адгезии 1 (sVCAM-1) – «Bender MedSystems GmbH» (Австрия). Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм.

Полученные цифровые данные были подвергнуты статистическому анализу и представлены в виде таблицы и графиков. Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем достоверной вероятности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований были получены данные, представленные в таблице.

В сыворотке крови пациенток основной группы не выявлено достоверного повышения концентрации провоспалительного цитокина ФНО- α , нарастание содержания которого характерно для острой стадии воспалительного процесса. Указанное подтверждает данные клинико-лабораторного обследования пациенток, свидетельствующего об отсутствии у них острого воспалительного процесса. Однако в перитоне-

альной жидкости пациенток основной группы его содержание было достоверно выше (в 1,72 раза), это позволяет сделать заключение о том, что при ремиссии патологического процесса, несмотря на отсутствие клинико-лабораторных признаков воспалительного процесса, определяется активность местного воспалительного процесса. Кроме того, известно, что высокие концентрации ФНО- α наблюдаются при многих осложнениях физиологического течения беременности, что позволяет рассматривать его повышение на местном уровне как неблагоприятный фактор для процессов зачатия и гестации [4, 5, 11, 16].

У пациенток основной группы в сыворотке крови выявлено достоверное – в 2,82 раза – повышение концентрации ИНФ- γ относительно данных, полученных в группе сравнения, аналогичное, но более выраженное увеличение содержания этого цитокина было выявлено в их перитонеальной жидкости (в 4,52 раза). Учитывая, что ИНФ- γ является одним из важнейших эндогенных модуляторов, необходимых для развития как индуцибельной фазы иммунного реагирования, так и специфических иммунных реакций, полученные результаты свидетельствуют о том, что при ремиссии изучаемого патологического процесса определяется активация индуцибельной фазы иммунного реагирования в ответ на антигенную стимуляцию из очага хронического воспаления. Данные научной литературы свидетельствуют об увеличении содержания ИНФ- γ при многих осложнениях физиологического течения беременности, что связано с активацией Th1-пути иммунного реагирования и развитием воспаления. Это также позволяет рассматривать установленное повышение его концентраций как один из возможных факторов, участвующих в механизмах развития бесплодия у обследованных женщин [4, 5, 16].

Таблица

Содержание изучаемых цитокинов и молекул адгезии в перитонеальной жидкости и сыворотке крови пациенток обследованных групп ($M \pm m$)

Показатель	Перитонеальная жидкость		Сыворотка крови	
	Группа сравнения, $n = 15$	Основная группа, $n = 50$	Группа сравнения, $n = 15$	Основная группа, $n = 50$
ФНО- α , пг/мл	13,7 \pm 1,1	23,6 \pm 0,9*	26,8 \pm 5,3	34,4 \pm 5,9
ИЛ-4, пг/мл	15,7 \pm 0,8	23,7 \pm 1,6*	38,5 \pm 9,1	84,9 \pm 12,5*
ИЛ-6, пг/мл	19,3 \pm 1,3	68,1 \pm 10,9*	28,8 \pm 4,3	47,0 \pm 4,2*
ИНФ- γ , пг/мл	20,8 \pm 1,9	94,2 \pm 8,1*	32,8 \pm 6,8	93,4 \pm 9,7*
MCP-1, пг/мл	148,2 \pm 3,1	394,6 \pm 42,1*	126,7 \pm 7,2	190,8 \pm 21,1*
sVCAM-1 нг/мл	117,8 \pm 5,1	352,8 \pm 47,3*	491,3 \pm 24,6	992,6 \pm 109,3*

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы сравнения статистически значимо при $p < 0,05$.

При определении ИЛ-6 – провоспалительного цитокина, участвующего в процессах хронизации воспалительных процессов, активации синтеза специфических антител во второй фазе иммунного ответа при инфекционно-воспалительных заболеваниях, развитии аутоиммунного реагирования, установлено достоверное нарастание его концентрации в сыворотке крови (в 1,6 раза) и в перитонеальной жидкости (в 3,5 раза) обследованных пациенток основной группы. Полученные данные свидетельствуют о хроническом течении и активности местного воспалительного процесса, а также об активации гуморального звена иммунной системы в ответ на постоянную антигенную стимуляцию из очага хронического воспаления.

Определение содержания индуктора гуморального звена иммунной системы ИЛ-4, активация которого характерна для инфекций бактериальной этиологии, у обследованных пациенток основной группы выявило его достоверное увеличение в сыворотке крови (в 2,2 раза) и в перитонеальной жидкости (в 1,5 раза) относительно значений изучаемого показателя в группе сравнения. Выявленную закономерность можно трактовать как реакцию иммунной системы, направленную на стимуляцию синтеза антител и развитие гуморального иммунного ответа в ответ на персистенцию возбудителей патологического процесса из очага хронического воспаления. Кроме того, высокие концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови свидетельствуют о роли этого цитокина в развитии фибропластических и спаечных процессов, играющих значимую роль в развитии бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне хронических воспалительных заболеваний, что согласуется с данными, представленными в литературе о значимости ИЛ-4 в этих процессах [13, 17].

Несомненный интерес представляют данные, полученные при определении содержания МСР-1, являющегося мощным хемотаксическим и активирующим белком для клеток макрофагально-моноцитарного ряда, способным рекрутировать макрофаги в места развития деструктивно-воспалительного процесса, которые в зависимости от микроокружения становятся способными продуцировать различные стимулы [2]. В результате проведенного исследования показано, что содержание МСР-1 в сыворотке крови (в 1,5 раза) и в перитонеальной жидкости пациенток основной группы было достоверно выше (в 1,5 и 2,6 раза соответственно), чем у женщин группы сравнения. Выявленную закономерность можно расценивать как факт, подтверждающий предположение о наличии активности местного деструктивно-воспалительного процесса у паци-

енток основной группы и его роли в патогенезе повреждения органов репродуктивной системы, приводящего к развитию бесплодия.

Следующим этапом настоящего исследования было определение концентрации растворимой молекулы межклеточной адгезии 1 в исследуемых биологических жидкостях пациенток обследованных групп. Установлено, что при бесплодии на фоне ХВЗОМТ у пациенток основной группы происходит достоверное, более чем 2-кратное, повышение содержания sVCAM-1 в сыворотке крови и почти 3-кратное – в перитонеальной жидкости, относительно величин, полученных в группе сравнения. Полученные данные подтверждают сделанное выше заключение о роли активности местного воспалительного процесса в механизмах развития бесплодия, поскольку нарастание концентраций этой биологически активной молекулы отражает степень выраженности деструктивно-воспалительного процесса и эндотелиальной дисфункции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что, несмотря на отсутствие клинических проявлений хронического воспаления и нормативные значения общелабораторных показателей, у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне ХВЗОМТ в стадии клинической ремиссии наблюдается активность местного деструктивно-воспалительного процесса, а также определяется дисбаланс про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов. Указанное подтверждается достоверным повышением в сыворотке крови пациенток основной группы концентраций биологически активных веществ, являющихся маркерами активности воспаления (ИЛ-6, МСР-1, sVCAM-1), и ФНО- α , ИЛ-6, МСР-1, sVCAM-1 в перитонеальной жидкости. Развитие воспалительного процесса у пациенток основной группы сопровождается активацией иммунного реагирования на постоянную антигенную стимуляцию из очага хронического воспаления, о чем свидетельствует достоверное повышение в сыворотке крови и перитонеальной жидкости содержания индукторов гуморального (ИЛ-4) и клеточного иммунитета (ИНФ- γ). Кроме того, можно предположить, что процессы аутореактивности в свою очередь могут быть пусковым механизмом в формировании «порочного круга» развития деструктивно-воспалительного процесса в условиях клинической ремиссии хронического воспаления.

Выявленный дисбаланс цитокинов в исследуемых биологических жидкостях, вероятно, может являться значимым фактором, участвующим в

механизмах развития бесплодия, поскольку наличие очага хронического воспаления в органах репродуктивной системы приводит к развитию пролиферативных и спаечных процессов, препятствующих возникновению беременности, а также создает неблагоприятный для возникновения и развития беременности цитокиновый фон [3, 4, 8, 11, 13, 16–18, 21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каграманова Ж.А., Сускова В.С., Гусева Т.С. и др. Клинико-иммунологическое обоснование иммунотерапии больных с острыми воспалительными заболеваниями придатков матки // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2006. 6. (5). 29–33.
2. Оноприенко Л.В. Молекулярные механизмы регуляции активности макрофагов (обзорная статья) // Биоорганическая химия. 2011. 37. (4). 437–451.
3. Радзинский В.Е., Запертова Е.Ю. Прогестеронобусловленные изменения провоспалительных цитокинов при привычном невынашивании беременности // Рус. мед. журн. 2004. (13). 25–28.
4. Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Крошкина Н.В. и др. Роль ранних нарушений продукции цитокинов в формировании патологии беременности // Рос. иммунол. журн. 2007. 1. (3-4). 258–265.
5. Сухих Г.Т. Ванько Л.В. Иммунология беременности. М., 2003. 106 с.
6. Трунов А.Н., Ефремов А.В., Трунов Л.А. Принципы патогенетически обоснованной диагностики при иммуномодулирующей терапии хронических инфекционно-воспалительных заболеваний // Аллергол. иммунология. 2002. 3. (1). 117–122.
7. Трунова Л.А., Горбенко О.М., Шваюк А.П. и др. Активность иммунновоспалительного процесса у женщин репродуктивного возраста с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями придатков матки в стадии клинической ремиссии // Бюл. СО РАМН. 2008. 28. (1). 80–83.
8. Трунова Л.А., Горбенко О.М., Шваюк А.П. и др. Особенности иммунного реагирования у девушек пубертатного возраста с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза в стадии ремиссии // Int. J. Immunorehabil. 2010. 12. (2). 93–96.
9. Устинов Т.А., Артымук Н.В., Власов В.В., Пыжов А.Ю. Бесплодие в Кемеровской области // Мать и дитя в Кузбассе. 2010. (1). 37–39.
10. Фролов М.В., Халим Х. Оценка репродуктивной функции женщин при острых и хронических воспалительных заболеваниях придатков матки // Вест. Воронежского гос. техн. ун-та. 2006. 2. (7). 21–26.
11. Das C., Kumar V.S., Gupta S., Kumar S. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells // J. Reprod. Immunol. 2002. 53. (1-2). 257–268.
12. Genc M.R., Ford C.E. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2010. 22. (2). 116–121.
13. Kanellakis P., Ditiatkovski M., Kostolias G., Bobik A. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload // Cardiovasc. Res. 2012. 95. (1). 77–85.
14. Lee S.A., Tsai H.T., Ou H.C. et al. Plasma interleukin-1beta, -6, -8 and tumor necrosis factor-alpha as highly informative markers of pelvic inflammatory disease // Clin. Chem. Lab. Med. 2008. 46. (7). 997–1003.
15. Milewski R., Milewska A.J., Czerniecki J. et al. Analysis of the demographic profile of patients treated for infertility using assisted reproductive techniques in 2005–2010 // Ginekol. Pol. 2013. 84. (7). 609–614.
16. Ng S.C., Gilman-Sachs A., Thaker P. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy // Am. J. Reprod. Immunol. 2002. 48. (2). 77–86.
17. Postlethwaite A.E., Holness M.A., Katai H., Raghoebar R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4 // J. Clin. Invest. 1992. 90. (4). 1479–1485.
18. Romero R., Gotsch F., Pineles B., Kusano J.P. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury // Nutr. Rev. 2007. 65. (12). 194–202.
19. Rouchou B. Consequences of infertility in developing countries // Perspect. Public Health. 2013. 133. (3). 174–179.
20. Smith M., Hagerty K.A., Skipper B., Bocklage T. Chronic endometritis: a combined histopathologic and clinical review of cases from 2002 to 2007 // Int. J. Gynecol. Pathol. 2010. 29. (1). 44–50.
21. Trunov A., Obukhova O., Gorbenko O. et al. Cytokines, estradiol and progesterone in the plasma of women of reproductive age with pelvic inflammatory disease in remission // Adv. Biosci. Biotechnol. 2013. 4. (6). 727–730.
22. Van Oostrum N., De Sutter P., Meys J., Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis // Hum. Reprod. 2013. 28. (7). 1809–1815.
23. Ziller V., Hadji P., Thielscher C. et al. Prevalence of female subfertility in German gynecological practices // Gynecol. Endocrinol. 2013. 29. (8). 767–770.

BLOOD SERUM AND PERITONEAL FLUID CYTOKINES CONCENTRATIONS IN WOMEN WITH INFERTILITY AND CHRONIC INFLAMMATION OF REPRODUCTIVE SYSTEM

Liliya Alekseevna TRUNOVA¹, **Igor Olegovich MARINKIN²**,
Aleksandr Nikolaevich TRUNOV^{1,2}, **Vitaliy Mikhailovich KULESHOV²**,
Olga Olegovna OBUKHOVA¹, **Olga Mikhailovna GORBENKO¹**, **Alya Petrovna SHVAYUK¹**

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*

The purpose of the study was to investigate blood and peritoneal fluid concentrations of cytokines in women with infertility and chronic infectious inflammation (CII) of reproductive system. 65 patients were included in the study: 50 patients were diagnosed as tubal and peritoneal infertility and CII of reproductive system in remission; 15 patients were almost healthy women of comparable age. The concentrations of TNF- α , IL-4, IL-6, IFN γ , MCP-1 and sVCAM-1 were measured in blood serum and peritoneal fluid. Permanent activation of local inflammation and immune reactions activation found in clinical remission of CII have been shown to play an important role in the pathogenesis of infertility associated with CII of reproductive system. It was proven by the increase of the concentrations of inflammatory cytokines (IL-6, MCP-1, and sVCAM-1) and inducers of Th1 and Th2 pathways. The concentration of TNF- α was increased in peritoneal fluid and was within normal range in blood serum in women of the study group. Based on the results of our study we believe that chronic inflammation of reproductive system and associated cytokines imbalance may play a role in tubal and peritoneal infertility pathogenesis.

Key words: cytokines, chronic inflammation, infertility, immune response.

Trunova L.A. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, chief researcher of the laboratory of immunology

Marinkin I.O. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of obstetrics and gynecology, e-mail: rectornrgmu@yandex.ru

Trunov A.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of immunology of reproduction, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Kuleshov V.M. – doctor of medical sciences, professor of department of obstetrics and gynecology, e-mail: kuleshov_vm@mail.ru

Obukhova O.O. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory of immunology, e-mail: olga.o.obukhova@gmail.com

Gorbenko O.M. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of immunology, e-mail: gorbenko1956@yandex.ru

Shvayuk A.P. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of immunology, e-mail: alevtina.shvayuk@yandex.ru

ОСТЕОХОНДРАЛЬНЫЕ ПОРАЖЕНИЯ БЛОКА ТАРАННОЙ КОСТИ, СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ХИРУРГИЧЕСКОМУ ЛЕЧЕНИЮ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Василий Викторович КУЗНЕЦОВ, Игорь Анатольевич ПАХОМОВ

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

Проблема остеохондральных поражений блока таранной кости (ОПБТК) является актуальной и при этом недостаточно освещенной в отечественной профессиональной ортопедотравматологической литературе. ОПБТК приводят к катастрофически быстрому развитию тяжелого деформирующего остеоартроза голеностопного сустава у молодых трудоспособных пациентов. Актуальной проблемой в наши дни является ранняя диагностика до появления рентгенологических признаков поражения и до стадии «патологического перелома». При этом методом выбора лечения ОПБТК признается мозаичная остеохондропластика блока таранной кости. Старания ученых сводятся к снижению травматичности вмешательства, в будущем ожидается широкое применение биотехнологий, достижений тканевого инжиниринга и т. д. Внедрение в ортопедотравматологическую практику современных диагностических (мультиспектральная компьютерная томография (МСКТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), артроскопия и т.д.) и лечебных методов (клеточные технологии, тканевый инжиниринг и т. д.) привело к усложнению систематизации, оптимизации стратегии и тактики лечения. На сегодняшний день существует несколько направлений хирургического лечения ОПБТК, каждое из которых имеет свои достоинства и недостатки. Применение мозаичной остеохондропластики при хирургическом лечении ОПБТК наиболее полно отвечает поставленным задачам.

Ключевые слова: мозаичная остеохондропластика, остеохондральный аутооттрансплантат, костно-хрящевой дефект, артроскопия, остеохондральные поражения блока таранной кости, хирургия стопы и голеностопного сустава, блок таранной кости.

КРАТКАЯ ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Первая запись о повреждении таранной кости (ТК) относится к временам персидского царя Дария I (ок. 500 г. до н. э.) [28]. Геродот описывает успешное лечение травмы ТК египетским хирургом, но не уточняет характер вмешательства [28]. Остеохондральные поражения ТК были рассмотрены и признаны в 1888 Koniq [26]. В 1922 г. Karris применяет термин «рассекающий остеохондрит». Wagoner и Cohn [40] в 1931 г. сообщают об остеохондральных повреждениях ТК, связанных с травмой голеностопного сустава. Несколько лет спустя Berndt и Harty предложили анатомическое взаимоотношение между остеохондральными поражениями и травмой голеностопного сустава [9, 25, 26]. С современной точки зрения наиболее обоснованным оказалось предположение Mouchet, который в 1928 г. описал поражение ТК как заболевание неясной этиологии,

проявляющееся выраженным болевым синдромом в голеностопном суставе и быстро приводящее к его деформирующему артрозу.

АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТК

Общеизвестно, что ТК (лат. *talus*; синонимы: *надпяточная кость*, *astragalus*), вторая по величине среди костей предплюсны, формирует подвижный «узел», осуществляющий сложный комплекс активных и пассивных движений стопы. Посредством своих сочленений ТК обеспечивает передачу веса тела на стопу, осуществляет активный и пассивный локинг (замыкание) стопы в процессе движения. Важной особенностью анатомии ТК является площадь покрытия ее суставным хрящом, достигающая 70 % [22]. Обширное покрытие суставным хрящом объясняет особенности кровоснабжения ТК, которое возможно лишь через сеть анастомозов регио-

Кузнецов В.В. – врач-травматолог-ортопед отделения хирургии стопы и голеностопного сустава, e-mail: vkuznecovniito@gmail.com

Пахомов И.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель отделения хирургии стопы и голеностопного сустава, e-mail: pahomovigor@inbox.ru

нарных артерий. Так, передняя большеберцовая, задняя большеберцовая и малоберцовые артерии обеспечивают надкостничное и внутрикостное кровоснабжение ТК. Передняя большеберцовая артерия переходит в тыльную артерию стопы (*a. dorsalis pedis*) на уровне голеностопного сустава и имеет проксимальные и дистальные ответвления к ТК [15, 34]. «Ломкость» механизма кровоснабжения играет основную роль и при ее дегенеративных поражениях, в первую очередь при ОПБТК [11, 18, 32]. Сохранение архитектуры сосудистого русла ТК и предотвращение деструкции не поврежденных при травме ТК сосудов может обеспечить сохранность ее кровоснабжения и минимизировать травматичность хирургического пособия.

ЭТИОЛОГИЯ

Несмотря на то что основными причинами ОПБТК являются травмы голеностопной области, заболевание полиэтиологично. С начала исследования этиологии заболевания [25, 26] вплоть до 1959 г. [9] господствовала «травматическая» теория происхождения ОПБТК [37]. Ряд исследователей доказали травматическую природу ОПБТК в 94 и 62 % случаев латеральных и медиальных повреждений соответственно [5, 10, 30]. Остался открытым вопрос возникновения ОПБТК в случаях, когда травматического анамнеза не выявлено.

Этиологии ОПБТК у пациентов без повреждения голеностопной области в анамнезе также посвящена обширная литература. Повторяющиеся микротравмы, сосудистые нарушения в результате асептического некроза, врожденные факторы являлись основными причинами, вносящими вклад в развитие ОПБТК у таких пациентов [30, 36]. При анализе этиологии нетравматического генеза ОПБТК на основании данных морфологии их патологического субстрата сделаны выводы о возможной роли врожденных расстройств суставного хряща, остеохондропатии ТК, дисгемических расстройств в субхондральной зоне ТК [12, 36].

КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

Клиническая картина ОПБТК складывается из следующих признаков: боль, отек, тугоподвижность области голеностопного сустава. Необходима дифференциальная диагностика с заболеваниями, проявляющимися «суставным» синдромом и изолированными поражениями сухожилий, связок стопы и голеностопной области. ОПБТК поражают молодых пациентов трудоспособного

возраста и приводят к катастрофически быстрому развитию деформирующего остеоартроза голеностопного сустава. При этом специфических симптомов на ранних стадиях данного заболевания нет, что объясняет отсутствие настороженности клиницистов в отношении ОПБТК. В связи с этим ранняя диагностика является сложной задачей, зачастую пациент в течение долгого времени получает консервативное лечение и приходит на прием к ортопеду с развившейся картиной осложнений ОПБТК в виде патологических переломов блока ТК, деформаций стопы, тяжелого остеоартроза. В связи с этим у ортопеда резко сужается возможность эффективной помощи пациенту, в то время как на ранней стадии с помощью хирургического вмешательства методом мозаичной остеохондропластики представляется возможным сохранение сустава и предотвращение грозных вышеперечисленных осложнений. Настороженность клинициста, сбор тщательного анамнеза, применение современных диагностических методов (МСКТ, МРТ, артроскопии) позволяет выявить изменения в голеностопном суставе на начальной стадии остеохондральных поражений [2, 19, 24, 41].

ДИАГНОСТИКА

При наличии у пациента труднообъяснимой боли в голеностопном суставе (кружалгии) логично заподозрить ОПБТК. Необходимо рентгенологическое обследование в стандартных проекциях, и, так как на ранних стадиях оно малоинформативно, при подозрении на ОПБТК обязательной является МСКТ, которая позволяет получить изображение очага деструкции ТК, оценить его величину и локализацию. С целью уточнения величины зоны отека костного мозга рекомендуется проведение МРТ [1, 14], для уточнения степени синовита голеностопного сустава – УЗИ. Применяющиеся для диагностики радионуклидное сканирование, МСКТ с контрастированием являются вспомогательными методами исследования и применяются по дополнительным показаниям.

КЛАССИФИКАЦИЯ

Одной из первых попыток систематизации ОПБТК была основанная на данных рентгенографии классификация Berndt и Harty [9]. Однако в ней не обозначена стадия «отсутствия рентгеновских изменений» (стадия 0), что представляется значимым недостатком. С точки зрения современной тактики лечения ОПБТК более современные классификации, основанные на данных МСКТ и МРТ, предложенные Ferkel, Sgaglione, Anderson,

Hepple S., более удобны для практического травматолога-ортопеда, поскольку обозначают наиболее ранние стадии заболевания как показания к наименее инвазивным хирургическим методам лечения и, соответственно, способствуют лучшим результатам лечения [5, 13, 21]. Широкое внедрение в травматолого-ортопедическую практику артроскопических технологий привело к созданию Pritsch классификации, основанной на данных артроскопии [35]. Предложенный метод не лишен недостатков и получил дальнейшее развитие, будучи дополненным данными МРТ и МСКТ [29, 31]. В наше время возникают предложения новых классификаций в связи с развитием технологий для практического применения в клинике травматологии и ортопедии, разработанные Mintz и др. [31]:

А – хондральное поражение (только хрящ);
В – хондральное/субхондральное поражение (хрящ и нижележащая кость); С – субхондральное поражение (хрящ интактен); D – кистозное поражение (более 5 мм глубиной).

По стабильности: А – стабильные; В – нестабильные.

По смещению фрагментов: А – без смещения; В – со смещением.

По локализации: А – медиальный (передний, центральный или задний); В – латеральный (передний, центральный или задний); С – центральный (передний, центральный или задний).

По размеру поражения: А – малый размер (область меньше 1,54 см² до 15 мм в диаметре); В – большой размер (область больше 1,5 см² и более 15 мм в диаметре).

Поражение боковых поверхностей блока ТК.

ЛЕЧЕНИЕ

Консервативное лечение малоэффективно, используется при противопоказаниях к хирургическому вмешательству, применяются общепринятые в травматологии и ортопедии методы лечения. Появляющиеся возможности ранней диагностики обеспечивают внедрение в клиническую практику новых методов терапии, которые обеспечивают снижение травматичности лечения, сохраняют биомеханику сустава, уменьшают продолжительность восстановительного периода. Основная цель хирургического лечения – замещение «мертвых тканей живыми» с сохранением анатомии и структуры блока ТК, функции голеностопного сустава; предусматривается применение методик восстановления суставного хряща и подлежащей кости.

Стимуляция костного мозга. Задачей метода является стимуляция собственного регенератив-

ного потенциала ТК за счет активации клеточных и гуморальных механизмов. Для этого проводят абразивную хондропластику, кюрретаж, антеградное и ретроградное бурение, дебрайдмент с микрофрактурированием, в большинстве случаев под артроскопическим контролем. К недостаткам метода следует отнести высокую частоту формирования фиброзно-хрящевой ткани на месте поражения [3, 27].

Остеохондральные аутооттрансплантаты, мозаичная остеохондропластика. Хирургическая санация дефекта с его замещением аутокостью имеет своих сторонников [20, 38]. Костные аутооттрансплантаты из гребня крыла подвздошной кости или пяточной кости с успехом используются для лечения пациентов с такими формами ОПБТК, при которых кистозный дефект покрыт вышележащим неповрежденным суставным хрящом. Однако в большинстве случаев пациенты приходят к врачу на стадии патологического перелома ТК или в более поздних стадиях. В данных стадиях более перспективным представляется использование остеохондральных аутооттрансплантатов для замещения дефекта в блоке ТК. По классической методике Hangody проводится забор остеохондрального аутооттрансплантата из ненагружаемой части мыщелка бедра [6, 23] – таким образом некротизированный участок сустава заменяется собственным, полноценным остеохондральным аутооттрансплантатом. Обладая несомненными достоинствами, данный метод не лишен серьезных недостатков, а именно: проблема «болезненного донорского места», трудности сопоставления трансплантата к «материнскому ложу» на блоке ТК. Поиск решения этих проблем очень актуален в настоящее время.

Остеохондральная аллотрансплантация. Использование остеохондральных аллотрансплантатов для реконструкции поврежденных суставных поверхностей и заполнения костно-хрящевых дефектов больше чем 1 см в диаметре и глубиной более 5 мм имеет много сторонников [36, 39]. Описаны методики замены полусустава и суставной пары с хорошими результатами [4, 17]. Как правило, требуются остеотомия лодыжки для имплантации аллотрансплантата и использование различных конструкций (например, винтов малых размеров для его фиксации). Обнадеживающие результаты, к сожалению, сопровождаются необходимостью длительной иммобилизации оперированной конечности и большим количеством несращений аллотрансплантата с материнским ложем. Кроме этого недостатком считается трудность подбора донорского материала, учитывая индивидуальные особенности размера блока ТК, и др.

Имплантация аутологичных хондроцитов. На сегодняшний день в арсенале клинициста появляется такой метод лечения, как имплантация аутологичных хондроцитов для лечения ОПБТК, включающая в себя две хирургические процедуры. Вначале производится забор ткани гиалинового хряща у пациента, изъятые хондроциты подвергаются тонкой очистке от окружающих тканей и культивируются в лабораторных условиях в течение 3 недель для достижения амплификации (увеличения числа клеток в заготавливаемом материале). Подготовленные хондроциты имплантируются в санированный очаг поражения либо хирургическим путем, либо под контролем артроскопических методик [7, 8, 16, 33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день существует несколько направлений хирургического лечения ОПБТК, каждое из которых имеет свои достоинства и недостатки. Основной тенденцией в их развитии является ранняя диагностика заболевания и применение малоинвазивных методов оперативного лечения, направленных на ликвидацию зоны асептического некроза ТК и замещение возникшего дефекта тканевым комплексом с высоким регенеративным потенциалом. Применение мозаичной остеохондропластики при хирургическом лечении ОПБТК наиболее полно отвечает поставленным задачам. Однако проблема «болезненного донорского места» является серьезным ограничением применения мозаичной остеохондропластики, и задача поиска ее решения приобретает особое значение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исакова Т.М., Гюльназарова С.В., Дьячкова Г.В., Налесник М.В. Ранняя диагностика аваскулярного некроза блока таранной кости // *Гений ортопедии*. 2011. (3). 66–70.
2. Adleberg J.S., Smith G.H. Corticosteroid-induced avascular necrosis of the talus // *J. Foot Surg.* 1991. 30. (1). 66–69.
3. Alford J.W., Cole B.J. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options // *Am. J. Sports Med.* 2005. 33. (2). 295–306.
4. Alford J.W., Cole B.J. Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions // *Am. J. Sports Med.* 2005. 33. (3). 443–460.
5. Anderson I.F., Crichton K.J., Grattan-Smith T. et al. Osteochondral fractures of the dome of the talus // *J. Bone Joint Surg. Am.* 1989. 71. (8). 1143–1152.
6. Baltzer A.W., Arnold J.P. Bone-cartilage transplantation from the ipsilateral knee for chondral lesions of the talus // *Arthroscopy*. 2005. 21. (2). 159–166.
7. Baums M.H., Heidrich G., Schultz W. et al. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus // *J. Bone Joint Surg. Am.* 2006. 88. (2). 303–308.
8. Baums M.H., Heidrich G., Schultz W. et al. The surgical technique of autologous chondrocyte transplantation of the talus with use of a periosteal graft. Surgical technique // *J. Bone Joint Surg. Am.* 2007. 89 Suppl 2 Pt.2 170–182.
9. Berndt A.L., Harty M. Transchondral fractures (osteochondritis dissecans) of the talus // *J. Bone Joint Surg. Am.* 1959. 41-A 988-1020.
10. Canale S.T., Belding R.H. Osteochondral lesions of the talus // *J. Bone Joint Surg. Am.* 1980. 62. (1). 97–102.
11. Depreux R., Hollingshausen. Vascularisation arterielle de l'astragale // *Lille Chir.* 1963. 18. 188–194.
12. Elias I., Zoga A.C., Morrison W.B. et al. Osteochondral lesions of the talus: localization and morphologic data from 424 patients using a novel anatomical grid scheme // *Foot Ankle Int.* 2007. 28. (2). 154–161.
13. Ferkel R.D., Zanotti R.M., Komenda G.A. et al. Arthroscopic treatment of chronic osteochondral lesions of the talus: long-term results // *Am. J. Sports Med.* 2008. 36. (9). 1750–1762.
14. Gautier E., Kolker D., Jakob R.P. Treatment of cartilage defects of the talus by autologous osteochondral grafts // *J. Bone Joint Surg. Br.* 2002. 84. (2). 237–244.
15. Gelberman R.H., Mortensen W.W. The arterial anatomy of the talus // *Foot Ankle.* 1983. 4. (2). 64–72.
16. Giannini S., Buda R., Vannini F. et al. Arthroscopic autologous chondrocyte implantation in osteochondral lesions of the talus: surgical technique and results // *Am. J. Sports Med.* 2008. 36. (5). 873–880.
17. Gross A.E., Agnidis Z., Hutchison C.R. Osteochondral defects of the talus treated with fresh osteochondral allograft transplantation // *Foot Ankle Int.* 2001. 22. (5). 385–391.
18. Haliburton R.A., Sullivan C.R., Kelly P.J., Peterson L.F. The extra-osseous and intra-osseous blood supply of the talus // *J. Bone Joint Surg. Am.* 1958. 40-A. (5). 1115–1120.
19. Harris R.D., Silver R.A. Atraumatic aseptic necrosis of the talus // *Radiology.* 1973. 106. (1). 81–83.
20. Hassenpflug J., Ulrich H.W., Liebs T. et al. Vascularized iliac crest bone graft for talar defects: case reports // *Foot Ankle Int.* 2007. 28. (5). 633–637.
21. Hepple S., Winson I.G., Glew D. Osteochondral lesions of the talus: a revised classification // *Foot Ankle Int.* 1999. 20. (12). 789–793.
22. Higgins T.F., Baumgaertner M.R. Diagnosis and treatment of fractures of the talus: a comprehensive

review of the literature // *Foot Ankle Int.* 1999. 20. (9). 595–605.

23. *Hintermann B., Boss A., Schafer D.* Arthroscopic findings in patients with chronic ankle instability // *Am. J. Sports Med.* 2002. 30. (3). 402–409.

24. *Hirota Y., Hirohata T., Fukuda K. et al.* Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head // *Am. J. Epidemiol.* 1993. 137. (5). 530–538.

25. *Kappis M.* Weitere Beiträge zur traumatisch-mechanischen Entstehung der «spontanen» Knorpelablösungen (sogen. Osteochondritis dissecans) // *Dtsch. Z. Chir.* 1922. 171. (1-2). 13–29.

26. *König F.* Ueber freie Körper in den Gelenken // *Dtsch. Z. Chir.* 1888. 27. (1-2). 90–109.

27. *Kono M., Takao M., Naito K. et al.* Retrograde drilling for osteochondral lesions of the talar dome // *Am. J. Sports Med.* 2006. 34. (9). 1450–1456.

28. *Kuner E.H., Lindenmaier H.L., Münst P.* Talus fractures // *Major Fractures of the Pilon, the Talus, and the Calcaneus* / Eds. H. Tscherne and J. Schatzker. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1993. 71–85.

29. *Lee K.B., Bai L.B., Park J.G., Yoon T.R.* A comparison of arthroscopic and MRI findings in staging of osteochondral lesions of the talus // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2008. 16. (11). 1047–1051.

30. *Millington S.A., Grabner M., Wozelka R. et al.* Quantification of ankle articular cartilage topography and thickness using a high resolution stereophotography system // *Osteoarthritis Cartilage.* 2007. 15. (2). 205–211.

31. *Mintz D.N., Tashjian G.S., Connell D.A. et al.* Osteochondral lesions of the talus: a new magnetic resonance grading system with arthroscopic correlation // *Arthroscopy.* 2003. 19. (4). 353–359.

32. *Mulfinger G.L., Trueta J.* The blood supply of the talus // *J. Bone Joint Surg. Br.* 1970. 52. (1). 160–167.

33. *Peterson L., Brittberg M., Kiviranta I. et al.* Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability // *Am. J. Sports Med.* 2002. 30. (1). 2–12.

34. *Prasarn M.L., Miller A.N., Dyke J.P. et al.* Arterial anatomy of the talus: a cadaver and gadolinium-enhanced MRI study // *Foot Ankle Int.* 2010. 31. (11). 987–993.

35. *Pritsch M., Horoshovski H., Farine I.* Arthroscopic treatment of osteochondral lesions of the talus // *J. Bone Joint Surg. Am.* 1986. 68. (6). 862–865.

36. *Raikin S.M.* Stage VI: massive osteochondral defects of the talus // *Foot Ankle Clin.* 2004. 9. (4). 737–744, vi.

37. *Rendu A.* Fracture intra-articulaire parcellaire de la poulie astragalienne // *Lyon Med.* 1932. 150. 220–222.

38. *Tanaka Y., Omokawa S., Fujii T. et al.* Vascularized bone graft from the medial calcaneus for treatment of large osteochondral lesions of the medial talus // *Foot Ankle Int.* 2006. 27. (12). 1143–1147.

39. *Tasto J.P., Ostrander R., Bugbee W., Brage M.* The diagnosis and management of osteochondral lesions of the talus: osteochondral allograft update // *Arthroscopy.* 2003. 19. Suppl. 1. 138–141.

40. *Wagoner G.* Osteochondritis dissecans: A resume of the theories of etiology and the consideration of heredity as an etiologic factor // *Arch. Surg.* 1931. 23. (1). 1–25.

41. *Zizic T.M., Hungerford D.S., Stevens M.B.* Ischemic bone necrosis in systemic lupus erythematosus. II. The early diagnosis of ischemic necrosis of bone // *Medicine.* 1980. 59. (2). 134–142.

OSTEOCHONDRAL LESIONS OF THE TROCHLEA TALI: MODERN APPROACHES TO SURGICAL TREATMENT (REVIEW)

Vasili Viktorovich KUZNETSOV, Igor Anatolevich PAKHOMOV

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

Osteochondral lesions of the trochlea tali (OLTT) are a topical issue that is not sufficiently covered in the domestic professional orthopedic and trauma literature. OLTT lead to the dramatically rapid development of severe deforming osteoarthritis of the ankle joint in young patients able to work. Currently, the urgent problem is early diagnosis, before radiographic signs of lesions and before the «pathological fracture» stage. In this case, mosaic osteochondroplasty of the trochlea tali (МОСРТТ) is recognized as the method of choice for treating OLTT. Research is focused on decreasing injury of intervention. In the future, widespread use of biotechnology, achievements of tissue engineering, etc is expected. Introduction of modern diagnostic (MSCT, MRI, arthroscopy, etc.) and treatment methods (cell technologies, tissue engineering, etc.) in orthopedic and traumatologic practice led to complicated systematization and optimization of the treatment strategy and tactics. Today, there are several approaches to surgical treatment of OLTT, each of which has its advantages and disadvantages. The use of mosaic osteochondroplasty for surgical treatment of OLTT best meets the treatment objectives.

Key words: mosaic osteochondroplasty, osteochondral autograft, precalcaneal region, osteochondral defect, osteochondritis dissecans, arthroscopy, osteochondral lesions of the trochlea tali, foot and ankle joint surgery, trochlea tali.

Kuznetsov V.V. – traumatologist, e-mail: vkuznecovniito@gmail.com

Pakhomov I.A. – doctor of medical sciences, leading researcher, head of department for foot and ankle-joint surgery, e-mail: pahomovigor@inbox.ru

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОСТНОЙ ТКАНИ И СУСТАВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ГОЛОВКИ БЕДРА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НОЗОЛОГИЧЕСКИХ ФОРМАХ КОКСАРТРОЗА

**Денис Альбертович ДАВЫДОВ¹, Ашот Меружанович АВДАЛЯН²,
Ваграм Ваганович АГАДЖАНЯН¹, Елена Леонидовна ЛУШНИКОВА³,
Ирина Марковна УСТЬЯНЦЕВА¹**

¹ *Областной клинический центр охраны здоровья шахтеров
652509, г. Ленинск-Кузнецкий, 7 микрорайон, 9*

² *Алтайский филиал Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина
656049, г. Барнаул, ул. Никитина, 77*

³ *Институт молекулярной патологии и патоморфологии
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Настоящая статья посвящена исследованию морфометрических характеристик гистопатологических показателей головки бедра при коксартрозе. Согласно современным представлениям, не зависимо от этиологического фактора, коксартроз имеет сходные клинические, патогенетические и гистопатологические проявления. Несмотря на описанные в фундаментальных работах особенности гистопатологического строения головки бедра при коксартрозе, многие аспекты данной проблемы остаются еще не полностью раскрытыми. Цель исследования – установить гистопатологические особенности костной ткани и суставной поверхности головки бедра при различных нозологических формах коксартроза. Исследование проведено на операционном материале (головка бедренной кости) 127 пациентов с клинически выставленным диагнозом коксартроз III–IV стадии. Из полученного материала выпиливался фрагмент суставной поверхности и субхондральной костной ткани размерами 1,5 × 1,0 × 0,5 см. Фиксацию и декальцинацию выпиленных фрагментов проводили в растворе ЭДТА. После декальцинации выполняли гистологическую проводку материала с дальнейшим заключением его в парафин и изготовлением гистологических срезов, которые исследовали на световом микроскопе. Средний возраст пациентов (62 женщины, 65 мужчин) составил 56,4 года. В результате выполненной работы установлено, что суставная поверхность и костная ткань головки бедра имеют ряд особенностей в зависимости от нозологической формы коксартроза: идиопатический коксартроз характеризуется резким истончением костных балок и уменьшением их площади; при диспластическом коксартрозе суставная поверхность резко истончена, костная ткань с выраженным фиброзом, толщина и площадь костных балок максимальны; коксартроз посттравматического генеза характеризуется максимально выраженными фиброзными изменениями суставной поверхности; при коксартрозе постишемического генеза толщина суставной поверхности остается максимальной, а выраженность ее фиброза и костной ткани имеют минимальные проявления.

Ключевые слова: гистопатологическая характеристика костной ткани, морфометрия, суставная поверхность.

Изучение гистопатологических характеристик удаленной при эндопротезировании головки бедренной кости представляет интерес как для клинической практики, так и в теоретическом аспекте. Выявление особенностей строения головки бедра при коксартрозе и установление его этиологического фактора могут иметь ключевое

значение в снижении риска послеоперационных осложнений и помочь в поиске способов профилактики контралатерального прогрессирования процесса [11, 13]. В настоящее время наиболее частой и тяжелой формой остеоартроза является коксартроз. Данное заболевание характеризуется преимущественно дегенеративными изменениями

Давыдов Д.А. – врач, патологоанатомическое отделение, e-mail: denis260586@rambler.ru

Авдалян А.М. – д.м.н., зав. лабораторией

Агаджанян В.В. – д.м.н., главный врач

Лушникова Е.Л. – д.м.н., директор

Устьянцева И.М. – д.м.н., зав. лабораторией

ми суставного хряща и субхондральной кости [8]. В зависимости от этиологического фактора выделяют первичный (идиопатический) и вторичный (диспластический, посттравматический, постшемический) коксартроз [3].

Согласно современным представлениям, независимо от этиологического фактора, коксартроз имеет сходные клинические, патогенетические и гистопатологические проявления [6].

Несмотря на описанные особенности гистопатологического строения головки бедра при коксартрозе, многие аспекты данной проблемы остаются еще не полностью раскрытыми [10]. Исходя из анализа литературы, данные, касающиеся морфометрической характеристики хрящевой и костной ткани головки бедра при коксартрозе, единичны и описаны преимущественно при его постшемической форме. Кроме того, практически полностью отсутствуют сведения о выраженности фиброза и морфометрических особенностях суставной поверхности и костной ткани головки бедра при других нозологических формах коксартроза [9, 12].

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы стало установление гистопатологических особенностей костной ткани и суставной поверхности головки бедра при различных нозологических формах коксартроза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на операционном материале 127 пациентов (62 женщины, 65 мужчин) с клинически выставленным диагнозом коксартроз III–IV стадии, поступавших в отделение травматологии и ортопедии Областного клинического центра охраны здоровья шахтеров (г. Ленинск-Кузнецкий) для эндопротезирования тазобедренного сустава. Объектом морфологического исследования служили 127 головок бедренных костей, удаленных при эндопротезировании тазобедренного сустава у этих пациентов.

Из полученного материала в вертикальном направлении выпиливался фрагмент суставной поверхности и субхондральной костной ткани объемом 0,75 см³ (размерами 1,5 × 1,0 × 0,5 см). Фиксацию и декальцинацию выпиленных фрагментов проводили в растворе ЭДТА (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) согласно общепринятой методике [4].

После декальцинации выполнялась гистологическая проводка материала с дальнейшим заключением его в парафин. Серийные гистологические срезы (по 4–6 срезов с одного фрагмента) толщиной 3–5 мкм готовили на ротационном микротоме (Accu-Cut SRM 200, Китай) с после-

дующей окраской гематоксилином и эозином, гематоксилином и пикрофуксином (по Ван Гизону) и исследованием на световом микроскопе (Nicon Ci-S, Китай) с использованием цифровой фотокамеры (Nicon DS-Fi2, Япония). Морфометрические измерения проводили с использованием программного обеспечения NIS-Elements BR 4.30.00.

Выраженность фиброза оценивали путем определения площади фиброзной ткани в 5 случайных полях зрения на срезах, окрашенных по Ван Гизону, при увеличении микроскопа × 100 [1]. При площади фиброза до 25 % присваивали «0» баллов, от 25 до 49 % – «1» балл, от 50 до 74 % – «2» балла, 75 % и более – «3» балла.

Проверку нормальности распределения данных выполняли с помощью критерия Шапиро–Уилка (W). Мерой центральной тенденции являлась медиана (Me), мерой рассеяния – интерквартильный интервал (LQ – UQ). Для выявления различий между группами использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Корреляционный анализ в представленном исследовании проводили с использованием двух критериев: коэффициента ранговой корреляции Спирмена и коэффициента ранговой корреляции Кендалла [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Медиана возраста пациентов составила 56,4 (51–65) года. Возраст больных в группе коксартроза идиопатического генеза оказался на 10 лет больше, чем в группе пациентов с посттравматическим и постшемическим коксартрозом ($p < 0,05$ в обоих случаях).

Гистологическое исследование головки бедра при посттравматическом коксартрозе показало мозаичную структуру суставной ткани – участки неизменного гиалинового хряща чередуются с зонами клеточной диссоциации изогенных групп хондроцитов с признаками кариопикноза, кариорексиса, плазморексиса. В местах разрушения хрящевой пластинки обнаруживается фиброзная ткань. В субхондральной костной ткани чередуются очаги отека и фиброза костного мозга различного размера.

Гистологический анализ головок бедренных костей, полученных от больных с постшемическим коксартрозом, указывает на некротические изменения в хрящевой ткани. В субхондральных отделах происходит асептический некроз жировой ткани, костного мозга и костных балок. Очаги некроза представлены гомогенными эозинофильными массами без воспалительной ин-

фильтрации по периферии. Совместно с процессом некроза происходит новый аппозиционный рост костной ткани, фиброз, склероз просвета кровеносных сосудов, а местами их тромбоз. На неровной истонченной трабекулярной поверхности обнаруживаются остеокласты.

При коксартрозе диспластического генеза микроскопически поверхность головки бедренной кости представлена склерозированной утолщенной субхондральной костной пластинкой, имеющей компактное строение и содержащей небольшие островки хрящевой и фиброзной ткани. Межбалочные пространства фиброзированы, трабекулы подлежащей губчатой кости с признаками остеосклероза.

Описанная в данной работе гистопатологическая картина строения суставной поверхности и костной ткани головки бедра при коксартрозе не противоречит ранее опубликованным исследовательским работам [2, 7].

Анализ исследуемого материала позволил выявить ряд морфометрических особенностей гистопатологических характеристик суставной поверхности и костной ткани головки бедра при различных нозологических формах коксартроза (см. таблицу).

Проведенное морфометрическое исследование показало, что наиболее выраженный фиброз суставной поверхности регистрируется при коксартрозе посттравматического генеза (рис. 1, а) с медианой 2,38 балла, а наименее выраженный – при постишемическом коксартрозе, 1,16 балла (рис. 1, б); наиболее выраженный фиброз костной ткани наблюдается при коксартрозе диспластического генеза (рис. 2, а; медиана 2,53 балла), наименее выраженный – при постишемиче-

ском коксартрозе (рис. 2, б; медиана 1,11 балла). В случае коксартроза диспластического генеза (рис. 3, а) медиана толщины суставной поверхности составляет 658,85 мкм, что в 2,3 раза меньше, чем при коксартрозе постишемического генеза (1524,17 мкм) (рис. 3, б). Максимальные толщина и площадь костных балок регистрируются в ткани головки бедра при коксартрозе диспластического генеза (рис. 4, а), а минимальные – при коксартрозе идиопатического генеза (рис. 4, б).

При исследовании особенностей корреляции гистопатологических показателей строения головки бедра при различных нозологических формах коксартроза выявлено, что в случае коксартроза постишемического генеза прослеживается прямая корреляционная связь между показателями толщины костных балок и их площадью ($r = 0,4$; $p = 0,032$). Полученные данные могут указывать на более активное протекание процессов ремоделирования костной ткани при данной нозологической форме коксартроза.

При коксартрозе посттравматического генеза обнаружена прямая корреляционная связь между возрастом больных и выраженностью фиброза суставной поверхности ($r = 0,6$; $p = 0,001$) и обратная связь между фиброзом суставной поверхности и толщиной костных балок ($r = -0,4$; $p = 0,04$). Данная особенность подтверждает возможность длительного воздействия травмирующего фактора на развитие коксартроза.

Данные корреляционного анализа возраста больных и выраженности фиброза суставной поверхности ($r = 0,6$; $p = 0,0004$), выраженности фиброза костного мозга и площади костных балок ($r = 0,4$; $p = 0,02$) в группе коксартроза диспластического генеза указывают на дебют данной пато-

Таблица

Морфометрическая характеристика суставной поверхности и костной ткани головки бедренной кости при различных нозологических формах коксартроза, Me (LQ – UQ)

Нозологическая форма коксартроза (n)	Фиброз суставной поверхности, баллы	Фиброз костной ткани, баллы	Толщина суставной поверхности, мкм	Толщина костных балок, мкм	Площадь костных балок, мм ²
Идиопатический (32)	2,14 (1–3)	2,18 (2–3)	1418,39 (1282–1564)	116,44 (108–125)	0,161 (0,145–0,184)
Диспластический (34)	2,06 (2–2)	2,53 (2–3)*	658,85 (593–728)*	262,74 (244–302)#	1,428 (1,328–1,567)#
Посттравматический (30)	2,38 (2–3)*	1,77 (2–2)	819,83 (696–946)	157,72 (146–172)	1,322 (1,209–1,486)
Постишемический (31)	1,16 (1–1)	1,11 (1–1)	1524,17 (1172–1784)	149,39 (137–166)	0,283 (0,256–0,303)

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,001$) отличия от соответствующих показателей: * – пациентов с коксартрозом постишемического генеза, # – пациентов с коксартрозом идиопатического генеза.

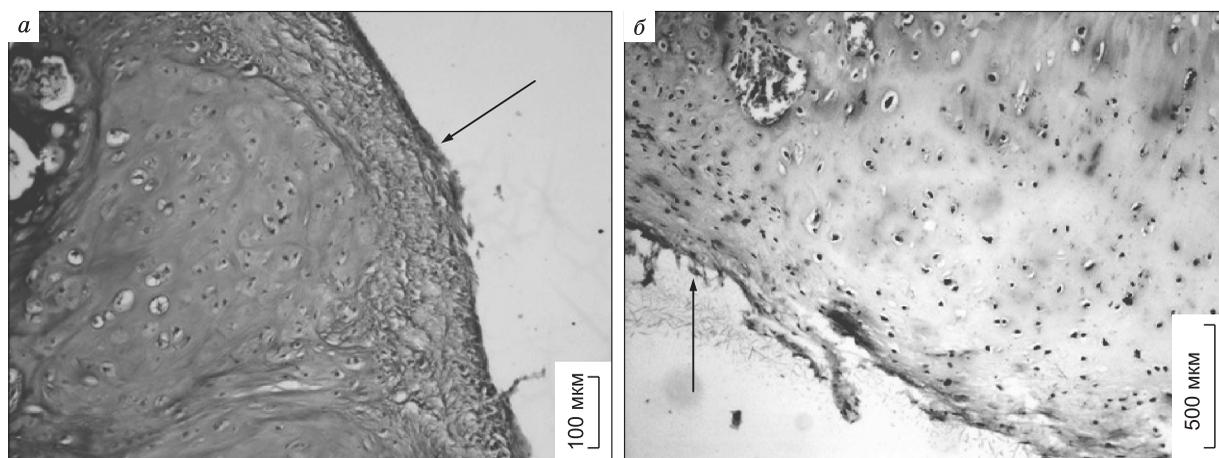


Рис. 1. Фиброз суставной поверхности головки бедренной кости (указано стрелками) при посттравматическом (а; ув. $\times 100$) и постишемическом (б; ув. $\times 40$) коксартрозе. Окраска по Ван Гизону

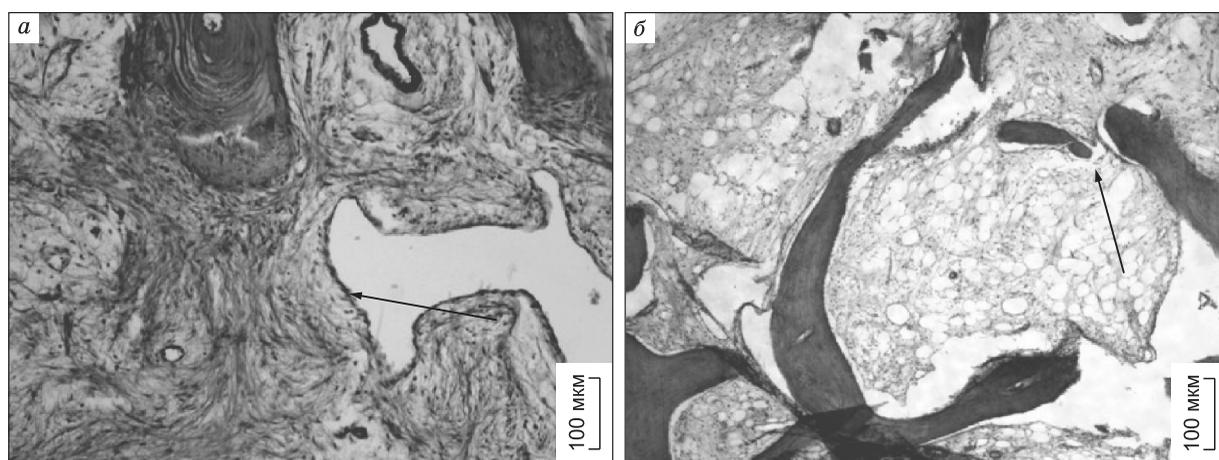


Рис. 2. Фиброз костной ткани (указано стрелками) головки бедренной кости при диспластическом (а) и постишемическом (б) коксартрозе. Окраска по Ван Гизону. Ув. $\times 100$

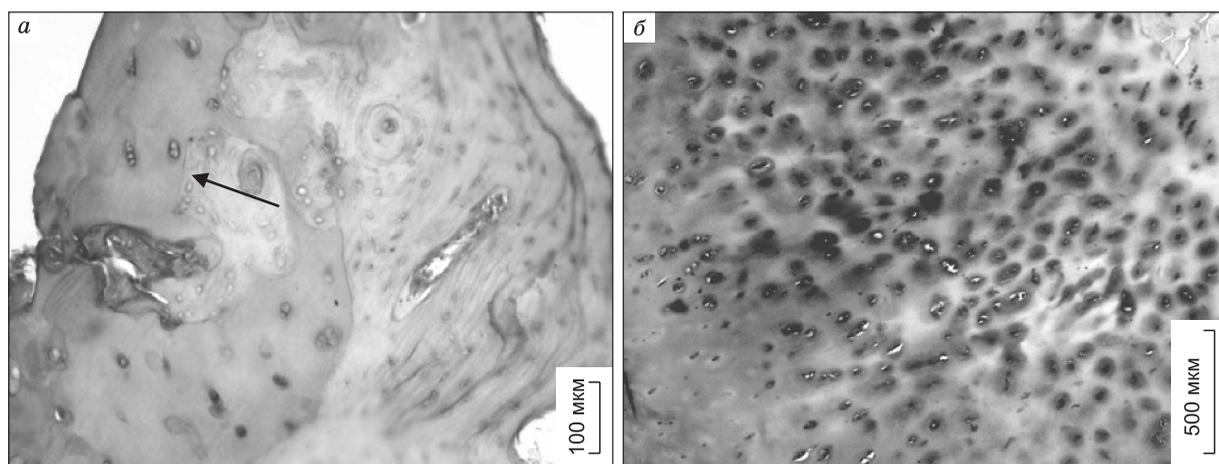


Рис. 3. Суставная поверхность (указана стрелкой) головки бедренной кости при диспластическом (а; ув. $\times 100$) и постишемическом (б; ув. $\times 40$) коксартрозе. Окраска гематоксилином и эозином

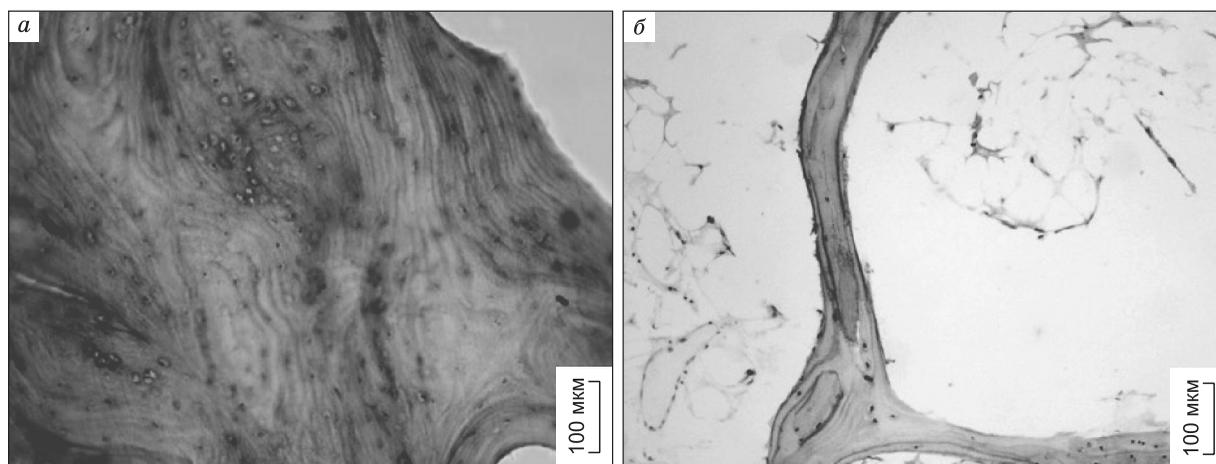


Рис. 4. Толщина костных балок головки бедренной кости при диспластическом (а) и идиопатическом (б) коксартрозе. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

логии в более раннем возрасте и, в то же время, на максимально выраженные компенсаторно-приспособительные процессы в суставной поверхности и костной ткани головки бедренной кости при данной нозологической форме коксартроза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения сравнительной морфометрической характеристики гистопатологических показателей выявлено, что суставная поверхность и костная ткань головки бедра имеют ряд особенностей в зависимости от нозологической формы коксартроза.

Идиопатический коксартроз характеризуется наиболее выраженным истончением костных балок и уменьшением их площади.

При диспластическом коксартрозе суставная поверхность значительно истончена, в костной ткани преобладают фиброзные изменения. Толщина и площадь костных балок имеют максимальные значения.

Коксартроз посттравматического генеза характеризуется максимально выраженными фиброзными изменениями суставной поверхности.

При коксартрозе посттравматического генеза толщина суставной поверхности остается наибольшей, а выраженность ее фиброза и костной ткани имеют незначительные проявления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдалян А.М., Бобров И.П., Климачев В.В. и др. Прогностическое значение исследования плотности сосудов микроциркуляторного русла в опухоли и перитуморозной зоне по данным выявления белка CD31 и количества аргирофильных белков области ядрышкового организатора (AGNOR) в эн-

дотелии при лейомиосаркоме тела матки // Фундаментальные исследования. 2010. (5). 12–20.

2. Гольдберг О.А., Гришина Л.П., Каня О.В. и др. К вопросу патоморфологии головки бедренной кости при коксартрозе III и IV стадий // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2012. (4, Ч. 2). 175–178.

3. Милуков А.Ю., Устьянцев Д.Д., Гилев Я.Х., Мазеев Д.В. Анализ ближайших результатов лечения пациентов после первичного тотального эндопротезирования тазобедренного сустава // Поли-травма. 2015. (2). 64–70.

4. Пеишков М.В. Декальцинация в гистологической лабораторной технике // Арх. патологии. 2012. (6). 43–45.

5. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с.

6. Шостак Н.А. Коксартроз и периартикулярная патология области бедра – особенности клинических проявлений, диагностика, подходы к терапии // Современ. ревматология. 2012. (1). 15–21.

7. Kamal D., Trăistaru R., Alexandru D.O. et al. Morphometric findings in avascular necrosis of the femoral head // Rom. J. Morphol. Embryol. 2012. 53. (3, Suppl.). 763–767.

8. Lane N.E., Brandt K., Hawker G. et al. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis // Osteoarthritis Cartilage. 2011. 19. 478–482.

9. Mukisi-Mukaza M., Gomez-Brouchet A., Donkerwolcke M. et al. Histopathology of aseptic necrosis of the femoral head in sickle cell disease // Int. Orthop. 2011. 35. (8). 1145–1150.

10. Navas A., Kassarian A. Bone marrow changes in stress injuries // Semin. Musculoskelet. Radiol. 2011. 15. (3). 183–197.

11. Tripathy S.K., Goyal T., Sen R.K. Management of femoral head osteonecrosis: Current concepts // Indian J. Orthop. 2015. 49. (1). 28–45.

12. Wang C., Wang X., Xu X.L. et al. Bone microstructure and regional distribution of osteoblast and osteoclast activity in the osteonecrotic femoral head // PLoS One. 2014. 9. (5). e96361.

13. Yu X., Jiang W., Pan Q. et al. Umbrella-shaped, memory alloy femoral head support device for treatment of avascular osteonecrosis of the femoral head // Int Orthop. 2013. 37. (7). 1225–1232.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS OF THE BONE TISSUE AND ARTICULAR SURFACE OF THE FEMORAL HEAD IN THE COXARTHROSIS' DIFFERENT NOSOLOGICAL ENTITIES

Denis Al'bertovich DAVYDOV¹, Ashot Meruzhanovich AVDALYAN²,
Vagram Vaganovich AGADZHANYAN¹, Elena Leonidovna LUSHNIKOVA³,
Irina Markovna UST'YANTSEVA¹

¹ Regional Clinical Center of the Miners' Health Protection
652509, Leninsk-Kuznetsky, 7th district str., 9

² Altai Branch of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
656049, Barnaul, Nikitin str., 17

³ Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

The present article is devoted to the examination of the morphometric characteristics of the histopathological parameters of the femoral head in coxarthrosis. According to the up-to-date perceptions, regardless of the etiological factor, the coxarthrosis has the similar clinical, pathogenetic and histopathological manifestations. Despite the histopathological construction patterns of the femoral head in coxarthrosis described in the fundamental works, many aspects of this problem are not yet completely detected. The aim of the study is the assessment of the histopathological patterns of the bony tissue and articular surface of the femoral head in the coxarthrosis' different nosological entities. The study was performed on the operational material (head of femur) of 127 patients with clinically presented diagnosis "III-IV stages coxarthrosis". The articular surface's and subcartilaginous bony tissue's fragment was carved of the obtained material, its sizes were 1.5x1.0x0.5 cm. Fixation and decalcination of the carved fragments were carried out in the EDTA solution. After decalcination there was a histological guiding of the material with its further encasement in a wax and making the histologic sections. The examination was performed using the light microscope. The mean age of the patients was 56,4 years (62 women, 65 men). Described in this article histopathological presentation of the structure of the articular surface and bony tissue of the femoral head in coxarthrosis does not contradict the earlier published research works. Due to the performed work the comparative morphometric characteristics of the histopathological indices of the bony tissue and articular surface of the femoral head in the coxarthrosis' different nosological entities became possible. The following details were determined: the articular surface's and bony tissue of the femoral head have a features sequence depending on the coxarthrosis' nosological entity: self-existing coxarthrosis is characterized by dramatic thinning of the bone rods and decrease of their surfaces; in dysplastic coxarthrosis the articular surface is acutely thinned, expressed fibrosis of the bony tissue, the maximal thickness and space of the bone rods; post-traumatic genesis coxarthrosis is characterized maximally expressed fibrotic changes of the articular surface; the thickness of the articular surface is maximal in post-ischemic genesis coxarthrosis, and evidence of its fibrosis and bony tissue have the minimal manifestations.

Key words: histopathological characteristics of the bony tissue, morphometry, articular surface.

Davydov D.A. – physician of pathologic anatomy department, e-mail: denis260586@rambler.ru

Avdalyan A.M. – doctor of the medical sciences, head of the laboratory

Agadzhanian V.V. – doctor of the medical sciences, academician of RAS, head physician

Lushnikova E.L. – doctor of the biological sciences, director

Ust'yantseva I.M. – doctor of the biological sciences, head of the laboratory

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТАКТНОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В УСЛОВИЯХ ЧРЕСКОСТНОГО ОСТЕОСИНТЕЗА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ

Леонид Борисович РЕЗНИК¹, Константин Юрьевич РОЖКОВ¹,
Герман Григорьевич ДЗЮБА¹, Евгений Валерьевич ПЕНЬКОВ²,
Сергей Александрович НИКИТЕНКО², Ольга Сергеевна ВОЖОВА²,
Валентина Алексеевна КАРАВАЕВА², Дмитрий Викторович КОТОВ²,
Алена Анатольевна ЕЛЬЦОВА¹

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

² Медико-санитарная часть № 4
644000, г. Омск, ул. Воровского, 62А

Нарушение репаративной регенерации костной ткани при лечении открытых переломов представляет собой актуальную проблему. Одним из факторов активации остеогенеза является низкочастотный ультразвук. Цель исследования – улучшение результатов лечения открытых переломов длинных трубчатых костей путем сочетания внеочагового чрескостного остеосинтеза и контактного ультразвукового воздействия. **Материал и методы.** Исследование проводилось на 18 пациентах, получивших открытые переломы костей голени типа 42 (43) A₁₋₂₋₃, B₁₋₂₋₃ по классификации АО-ASIF, II и III типа по классификации Gustilo и Anderson. Оперативное лечение заключалось в остеосинтезе голени аппаратом внешней фиксации, при этом больные основной группы дополнительно получали контактное ультразвуковое воздействие. **Результаты.** У пациентов основной группы спадение отека травмированной конечности наблюдалось в более ранние сроки ($p \leq 0,05$), что создает благоприятные условия для заживления раны (у пациентов основной и контрольной групп заживление первичным натяжением происходило соответственно в 100 и 67 % случаев). Также в более ранние сроки наблюдалось купирование болевого синдрома ($p \leq 0,05$), формирующаяся костная мозоль характеризовалась большей плотностью и более высоким содержанием кальция ($p \leq 0,05$). **Вывод.** Низкочастотное ультразвуковое воздействие улучшает результаты лечения открытых переломов.

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

Лечение открытых переломов костей голени, которые составляют до 70 % всех открытых переломов костей скелета [2], является актуальной проблемой. Частота неудовлетворительных результатов лечения таких переломов остается высокой и достигает 50 % [3], а нарушение консолидации – 30 % [3]. При лечении открытых переломов важное значение имеет не только повреждение кости, но и травма мягких тканей, состояние которых во многом определяет исход

патологии [5]. Основным способом лечения открытых переломов остается внеочаговый чрескостный остеосинтез [8]. Однако изолированное использование аппарата внешней фиксации в полном объеме не решает проблемы нарушения репаративной регенерации кости и заживления мягких тканей [6], в ряде случаев требуется дополнительное стимулирующее воздействие на кость и мягкие ткани, к числу которых относится низкочастотный ультразвук [1, 4, 7]. Эффект

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: konsroj@yandex.ru

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

Пеньков Е.В. – зав. отделением травматологии, e-mail: penkoff@list.ru

Никитенко С.А. – врач-рентгенолог, e-mail: 79139684444@yandex.ru

Вожова О.С. – врач функциональной диагностики, невролог

Каравеева В.А. – зав. отделением лабораторной диагностики

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

Ельцова А.А. – аспирант кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней

от ультразвукового воздействия тем выше, чем меньше расстояние от источника колебаний, так как, проходя через мягкие ткани, ультразвуковые волны затухают. Поэтому чем больший мягкотканый массив располагается перед костью, тем меньше интенсивность доходящего до нее ультразвука и тем меньше его эффект [1]. Учитывая это, важно использовать способ стимулирующего воздействия низкочастотного ультразвука, позволяющий достичь максимального эффекта и на мягкие ткани, и на костную ткань.

Цель исследования – улучшение результатов лечения открытых переломов длинных трубчатых костей путем сочетания внеочагового чрескостного остеосинтеза и контактного ультразвукового воздействия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Критерии включения пациентов в исследование: получение письменного информированного согласия на участие в исследовании; получение согласия на обработку персональных данных; возраст от 18 до 70 лет; наличие открытого перелома костей голени, тип переломов 42 (43) A_{1-2,3}, B_{1-2,3} по классификации АО-ASIF, II и III A – по классификации Gustilo и Anderson; давность получения перелома не более 24 ч.

Критерии исключения: наличие одновременного сопутствующего тяжелого повреждения других органов и систем; наличие тяжелой декомпенсированной сопутствующей соматической патологии; наличие аномалий развития костей; наличие психических заболеваний, препятствующих адекватному сотрудничеству в процессе лечения; хронические воспалительные заболевания костей поврежденной конечности; необратимые изменения в мягких тканях в результате повреждения магистральных кровеносных сосудов.

Пациенты случайным образом были разделены на 2 равные по количеству участников группы, больные основной группы на протяжении лечения получали контактное низкочастотное ультразвуковое воздействие в условиях внеочагового чрескостного остеосинтеза, пациенты контрольной группы – только стандартное лечение аппаратом внешней фиксации.

В клиническом исследовании участвовало 18 человек, которые поступили в отделение травматологии и ортопедии БУЗОО «МСЧ № 4» г. Омска в 2014 и 2015 гг. У всех пациентов имелись открытые переломы костей голени, тип переломов 42 (43) A_{1-2,3}, B_{1-2,3} по классификации АО-ASIF, II и III A – по классификации Gustilo и Anderson. Травма получена в сроки $3,16 \pm 1,7$ ч в результате низкоэнергетического воздействия

и была изолированной. Всем пациентам при поступлении выполнялось стандартное обследование и оперативное лечение в объеме первичной хирургической обработки раны, остеосинтеза костей голени аппаратом внешней фиксации, для которого использовалась модель спице-стержневого аппарата внешней фиксации, состоящего из 4 соединенных штангами колец, спиц, стержней-шурупов. После достижения репозиции в проксимальный конец дистального отломка и/или дистальный конец проксимального отломка устанавливался стержень-шуруп стандартный (контрольная группа) или канюлированный (основная группа) с фиксацией при помощи кронштейна с хвостовиком к кольцу. Первичная хирургическая обработка раны осуществлялась в соответствии с принятыми принципами (рассечение раны, иссечение нежизнеспособных тканей, удаление инородных тел, гемостаз, послойное ушивание раны). После ушивания раны осуществлялось пассивное дренирование резиновым дренажем.

Пациентам основной группы через отверстие стержня-шурупа, канюлированного в полость костно-мозгового канала, вводился волновод, соединяемый с акустическим узлом ультразвукового аппарата. Процедура озвучивания осуществлялась в условиях перевязочной с соблюдением правил асептики, антисептики. Ультразвуковое воздействие выполнялось ежедневно, начиная со 2 суток после операции, в течение всего времени пребывания в стационаре, после выписки – 1 раз в 3 дня.

Состояние мягкотканых структур оценивалось по времени исчезновения отека, характеру заживления послеоперационной раны. Также определялось время купирования болевого синдрома. Для определения степени отека измеряли длину окружности конечности на одном уровне и сравнивали ее с длиной окружности противоположной конечности. Заживление раны оценивалось по наличию краевых некрозов, характеру заживления (первичное, вторичное при наличии краевых некрозов), купирование болевого синдрома – по отказу пациентов от приема анальгетиков и их субъективному ощущению прекращения боли (визуальная аналоговая шкала боли).

Через 12 недель после операции всем пациентам выполнялась мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) со сканированием в двухэнергетическом режиме с устранением артефактов от металлоконструкций (MARS) на сканере GE 750HD, определялась оптическая плотность костной мозоли в единицах Хаунсфилда (HU) в различных ее участках, а также содержание кальция в мг/см³ в режиме GSI.

Перед демонтажем аппарата внешней фиксации всем пациентам выполнялась клиническая проба. Для этого раскручивались гайки на стержнях между средними кольцами, и пациент в течение 2 суток ходил с полной нагрузкой на оперированную конечность. При отсутствии болей, увеличения отека аппарат демонтировали.

При анализе полученных результатов методом Шапиро–Уилка было получено распределение, отличное от нормального. Поэтому при описании данных использовались методы непараметрической статистики – медиана, верхний и нижний квартили Me [HQ; LQ], при определении достоверности различий между группами применяли U-критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера, различия внутри группы оценивали с помощью критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отказ от анальгетиков и купирование болевого синдрома у пациентов основной и контрольной групп происходило соответственно на 3 [4; 3] и 6 [6; 5] сутки после операции, $p < 0,0005$. В основной группе отек достигал максимума на 2 сутки (увеличение объема голени на 2,4 [2,7; 2,1] см после операции ($p < 0,007$ по сравнению с другими периодами наблюдения в группе), с 3 суток он начал уменьшаться (1,9 [2,0; 1,6] см, $p < 0,007$ по сравнению с предыдущими периодами наблюдения) и полностью исчезал (объем голени увеличен не более чем на 0,5 см по сравнению со здоровой конечностью) на 6 [6; 5] сутки. В контрольной группе максимальный отек 3,0

[3,1; 2,9] см наблюдался на 2 и 3 сутки после операции ($p < 0,016$ по сравнению с другими периодами наблюдения в группе), с четвертых суток наблюдалось его уменьшение до 2,1 [2,4; 2,0] см ($p < 0,016$ по сравнению с предыдущими периодами наблюдения) с полным исчезновением на 8 [8; 7] сутки. На 2–7 сутки после операции группы значительно различались по объему увеличения конечности ($p \leq 0,005$), а также по времени исчезновения отека ($p \leq 0,002$).

Заживление послеоперационной раны первичным натяжением наблюдалось у всех пациентов основной группы; у 3 лиц контрольной группы формировались краевые некрозы, и рана заживала вторичным натяжением.

Во время ультразвукового воздействия пациенты оценивали ощущения как болевые, их интенсивность составляла 4 [5; 4] балла по визуальной аналоговой шкале боли, двое пациентов просили перед ультразвуковым воздействием введения ненаркотических анальгетиков. При этом через 10–11 сеансов озвучивания интенсивность боли оценивалась на 2 [2; 1] балла. Наступать на оперированную конечность пациенты начинали после купирования болевого синдрома, в основной группе – на 3,5 [4; 3] сутки, в контрольной – на 6 [7; 5] сутки, $p < 0,004$.

В результате выполнения МСКТ установлено, что оптическая плотность костной мозоли через 12 нед. после операции в основной группе составляла 678 [699; 590] HU, в контрольной – 460 [499; 415] HU ($p < 0,0003$; U 0,00, Z 3,5762) (рис. 1), содержание кальция в единице объема – соответственно 340 [387; 300] и 196 [214; 187] мг/см³

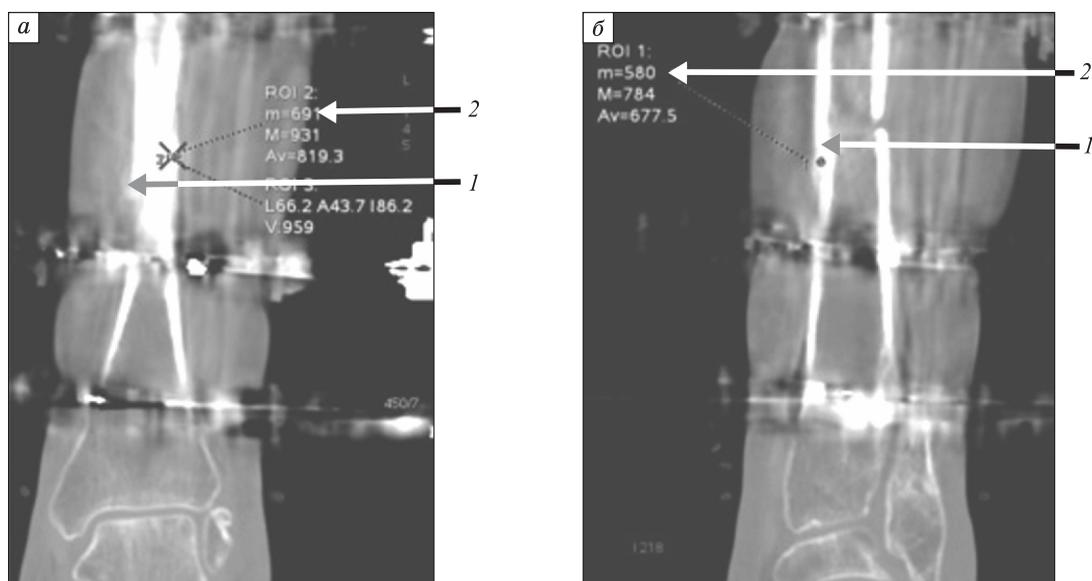


Рис. 1. Оптическая плотность костной мозоли в основной (а) и контрольной (б) группах; 1 – формирующаяся костная мозоль, 2 – средняя плотность костной мозоли, HU

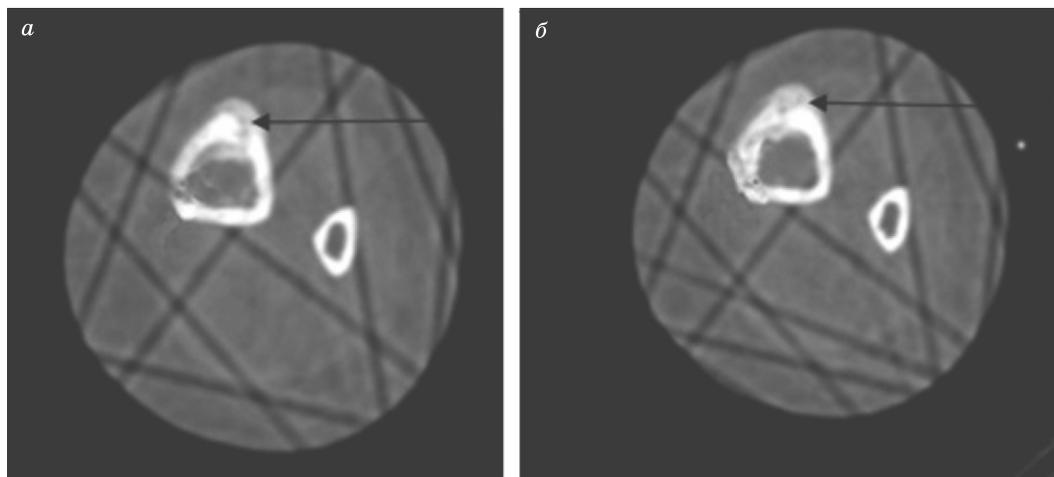


Рис. 2. Формирование костной мозоли в основной (а) и контрольной (б) группах; стрелкой показана формирующаяся костная мозоль

($p < 0,0003$; $U 0,00$, $Z 3,5762$). В основной группе костная мозоль формировалась равномерно по всей площади перелома и имела одинаковую оптическую плотность, в контрольной группе она была более выраженной в дистальной и проксимальной части косого перелома, в центральной части перелома – менее выраженной и имела меньшую оптическую плотность (рис. 2).

Демонтаж аппарата в основной группе осуществлялся через 14 [13;14] нед. после операции, в контрольной – через 16 нед. [16;17] ($p < 0,004$).

ОБСУЖДЕНИЕ

У всех пациентов после операции наблюдался отек оперированной конечности, однако у пациентов основной группы его выраженность была значительно меньше, а скорость исчезновения – существенно выше, чем у лиц группы контроля. С менее выраженным формированием отека и более быстрым его исчезновением связано раннее купирование болевого синдрома, обеспечившее пациентам основной группы возможность более раннюю опору на оперированную конечность. Также длительно существующий выраженный отек создает неблагоприятные условия для заживления раны, поэтому если в основной группе у всех пациентов оно происходило первичным натяжением, то у 3 больных контрольной группы – вторичным натяжением за счет появления краевых некрозов.

Ультразвуковое контактное воздействие на кость сопровождается болевыми ощущениями, однако их интенсивность была не настолько выраженной, чтобы хотя бы один пациент отказался от такого воздействия, и с течением времени она уменьшалась.

По данным МСКТ костная мозоль пациентов основной группы через 12 нед. после операции не только имела более высокую оптическую плотность, но и была более равномерной по всей площади перелома. У лиц контрольной группы мозоль была менее однородной (в центральной части перелома оптическая плотность меньше, чем в дистальной и проксимальной). Также в основной группе было выше содержание кальция в единице объема, т.е. костная мозоль имела не только большую площадь, но и большую плотность.

ВЫВОДЫ

1. Низкочастотное контактное ультразвуковое воздействие в условиях чрескостного остеосинтеза положительно влияет на заживление мягких тканей, способствуя уменьшению выраженности и увеличению скорости исчезновения отека (соответственно на 20 и 25 %), что создает благоприятные условия для заживления послеоперационной раны.

2. Низкочастотное контактное ультразвуковое воздействие способствует более быстрому (на 50 %) уменьшению интенсивности болевого синдрома.

3. Низкочастотное контактное ультразвуковое воздействие в условиях чрескостного остеосинтеза на 2–3 недели ускоряет формирование костной мозоли и увеличивает ее минеральную плотность.

4. В условиях контактного ультразвукового воздействия на 2–3 недели сокращается срок восстановления опороспособности конечности и наступления клинического выздоровления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян 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. Илларионов В.В., Шпаченко Н.Н., Давыдов Д.И. Анатомо-физиологические особенности голени и их роль в возникновении, течении и заживлении двойных переломов (обзор литературы) // Травма. 2009. 10. (1). <http://www.mif-ua.com/archive/article/20099>.
3. Петров Н.В., Бровкин С.В., Калашиник А.Д. и др. Оптимизация лечения открытых переломов голени с тяжелой травмой мягких тканей // Рос. мед. журн. 2013. (13). 815–817.
4. Fung C.H., Cheung W.H., Pounder N.M. Investigation of rat bone fracture healing using pulsed 1.5 MHz, 30 mW/cm² burst ultrasound – axial distance dependency // Ultrasonics. 2014. 54. (3). 850–859.
5. Hao J., Cuellar D.O., Herbert B. et al. Does the OTA Open Fracture Classification predict the need for limb amputation? A retrospective observational cohort study on 512 patients // J. Orthop. Trauma. 2015. [Epub ahead of print].
6. Popkov A.V., Kononovich N.A., Gorbach E.N. et al. Bone healing by using Ilizarov external fixation combined with flexible intramedullary nailing versus Ilizarov external fixation alone in the repair of tibial shaft fractures: experimental study // Sci. World J. 2014. 2014. ID 239791.
7. Ramli R., Reher P., Harris M., Meghji S. 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.
8. Zhuang P., Hong J., Chen W. et al. Clinical analysis of the rap stress stimulator applied for crus fracture after skeletal external fixation // Arch. Med. Sci. 2015. 11. (3). 612–618.

THE USE OF CONTACT LOW-FREQUENCY ULTRASONIC EXPOSURE UNDER CONDITIONS OF TRANSOSSEOUS OSTEOSYNTHESIS AT THE TREATMENT OF OPEN TIBIAL FRACTURES

Leonid Borisovich REZNIK¹, Konstantin Yurevich ROZHKO¹, Herman Grigor'evich DZYUBA¹, Evgeny Valerievich PENKOV², Sergei Aleksandrovich NIKITENKO², Olga Sergeevna VOZHOVA², Valentina Alekseevna KARAVAEVA², Dmitri Viktorovich KOTOV², Alena Anatolevna ELTSOVA¹

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

² *Hospital № 4
644000, Omsk, Vorovskogo str., 62 A*

Abnormality of reparative regeneration of bone tissue at open fractures treatment is an urgent problem. One of the factors of bone formation is a low-frequency ultrasound. Objective: to improve the results of treatment of open fractures of long bones by combining extrafocal transosseous osteosynthesis and contact ultrasonic treatment. Materials and Methods: The study was conducted on 18 patients with open fractures of the tibia bone of type 42 (43) A₁₋₂₋₃, B₁₋₂₋₃ (by classification AO-ASIF), II and type III by Gustilo and Anderson classification. The surgical treatment was performed by lower lecture osteosynthesis with the device of external fixation. Therewith the patients of the main group received contact ultrasound exposure. Results. The subsidence of injured limb swelling in the main group patients has been observed in the earlier stages ($p \leq 0.05$), that creates favorable conditions for wound healing (healing by the first intention was revealed in all patients of the main group and in 37 % of the control group patients). As well as the pain relief has been revealed in earlier stages ($p \leq 0.05$). Formed callus has been defined by greater density and higher content of calcium ($p \leq 0.05$). Conclusion - the impact of low-frequency ultrasound improves the results of treatment of open fractures.

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. – graduate student of the department of traumatology and orthopedics, e-mail: konsroj@yandex.ru

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

Penkov E.V. – head of the department of traumatology, e-mail: penkoff@list.ru

Nikitenko S.A. – doctor radiologist, e-mail: 79139684444@yandex.ru

Vozhova O.S. – doctor of functional diagnostics, neurologist

Karavaeva V.A. – head of the department of laboratory diagnostics

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

Eltsova A.A. – graduate student of the chair for diagnosis of internal non-communicable diseases

НАШ ОПЫТ ГОСПИТАЛЬНОЙ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА С ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST В РЕГИОНАЛЬНОМ СОСУДИСТОМ ЦЕНТРЕ

Константин Александрович КИРЕЕВ, Александр Валерьевич КРАСНОПЕЕВ

НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Челябинск ОАО «РЖД»
454048, Челябинск, ул. Доватора, 23

Цель исследования – анализ случаев госпитальной тромболитической терапии (ТЛТ) в региональном сосудистом центре (РСЦ). **Материал и методы:** представлены объемы реперфузионной терапии в 2014 г., в том числе фармакологической, на госпитальном уровне. **Результаты.** Реперфузионная терапия проведена 436 (67,9 %) больным: чрескожные коронарные вмешательства (ЧКВ) в изолированном виде – 326 (50,8 %), только ТЛТ – 36 (5,6 %), фармакоинвазивный метод – 74 (11,5 %). ТЛТ выполнялась в 110 (17,1 %) случаях, в 98 (15,2 %) – бригадами скорой медицинской помощи. Потребность в госпитальной ТЛТ возникла в 12 случаях (1,9 %). Основная причина – невозможность выполнить первичные ЧКВ в связи с занятостью ангиографической операционной – 9 наблюдений. В 8 случаях ТЛТ проведена рекомбинантным белком, содержащим аминокислотную последовательность стафилокиназы (фортеплазе, фортелизин®), и была эффективной. Всем больным успешно провели ЧКВ. **Заключение.** В условиях РСЦ госпитальная ТЛТ нами рассматривается исключительно как вынужденная мера, обусловленная простыми обстоятельствами (отказ пациента от коронарных интервенций или аллергия на контраст) или высокой загруженностью ангиографической операционной. Первые результаты применения российского препарата фортеплазе (фортелизин®) оставили позитивное впечатление. Дальнейшее накопление опыта определит место этого средства в клинической практике.

Ключевые слова: госпитальная тромболитическая терапия, чрескожное коронарное вмешательство, региональный сосудистый центр, реперфузионная терапия, острый инфаркт миокарда.

Болезни системы кровообращения имеют стратегически важное значение для российского здравоохранения по причине самой высокой смертности среди всех нозологий с прямым негативным влиянием на демографическую ситуацию в стране [1–4]. Для улучшения показателей в отечественной кардиологии активно ведутся научно-практические разработки, связанные с улучшением лечебно-диагностического процесса при остром коронарном синдроме (ОКС) и остром инфаркте миокарда (ОИМ). Параллельно в регионах открываются региональные сосудистые центры [9] для круглосуточного проведения чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ), имеющих доказанную высокую эффективность в восстановлении кровообращения при острой коронарной патологии [10].

В рамках Национального проекта «Здоровье» и Программы модернизации здравоохранения с 2011 г. в Челябинской области реализуется «Региональная программа специализированной медицинской помощи при ОКС», ключевым направлением которой стало создание сети ЧКВ-центров

для повсеместного и рутинного применения эндоваскулярных технологий у urgentных пациентов кардиологического профиля. В настоящее время в данной системе работают 6 первичных сосудистых отделений и 4 региональных сосудистых центра. Все население Челябинской области обслуживается данными медицинскими организациями с четкими порядками маршрутизации.

В условиях интенсивного потока экстренных пациентов с разнообразными клиническими проявлениями острой коронарной патологии найдется место любому виду реперфузионных вмешательств. Несмотря на эндоваскулярную ориентированность национальных и международных клинических рекомендаций [6, 7], в региональном сосудистом центре может возникнуть потребность в проведении госпитальной тромболитической терапии (ТЛТ).

Цель исследования – анализ клинических случаев госпитальной ТЛТ в медицинской организации, оказывающей специализированную медицинскую помощь в формате регионального сосудистого центра.

Киреев К.А. – к.м.н., врач по рентгенэндоваскулярным диагностике и лечению отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения, e-mail: kkireev83@mail.ru

Краснопеев А.В. – врач-реаниматолог отделения анестезиологии и реанимации, e-mail: lead_guitar@mai.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Челябинск ОАО «РЖД» (НУЗ ДКБ), являющегося одним из 4 региональных сосудистых центров Челябинской области, равнозначных по объемам медицинской помощи. На уровне данной медицинской организации проведен ретроспективный анализ статистических отчетов отделений кардиологии, реанимации и рентгенохирургии за 2014 г., на который приходится основное поступление экстренных пациентов (60,2 % больных) за трехлетний период работы (2012–2014 гг.) в рамках Региональной программы.

В 2014 г. в НУЗ ДКБ поступило 1396 пациентов с рабочим диагнозом «острый коронарный синдром». В результате проведенных лечебно-диагностических вмешательств установлено: ОИМ – 642 (46,0 %) случая, нестабильная стенокардия – 653 (46,8 %), острая коронарная патология не подтвердилась – 101 (7,2 %) случаев.

В отношении пациентов с ОИМ представлены объемы реперфузионной терапии, в том числе фармакологической, на госпитальном уровне. У больных с ТЛТ, выполненной в стационаре, для оценки эффективности использовались общепринятые критерии (клинические данные, результаты ЭКГ-диагностики и коронароангиографии).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего реперфузионные вмешательства проведены 436 (67,9 %) больным с ОИМ: ЧКВ в изолированном виде – 326 (50,8 %), только ТЛТ – 36 (5,6 %), фармакоинвазивный метод – 74 (11,5 %). Экстренные коронарные стентирования перенесли 400 (62,3 %) инфарктных пациентов. ТЛТ выполнялась в 110 (17,1 %) случаях, из них 98 (15,2 %) – бригадами скорой медицинской помощи и 12 (1,9 %) – дежурными кардиологами НУЗ ДКБ.

Возраст пациентов, которым проводилась госпитальная ТЛТ, варьировал от 51 до 75 лет, средний возраст составил $61,0 \pm 3,9$ года. Среди больных этой подгруппы преобладали лица мужского пола – 58,3 % (7 человек).

Основная причина проведения госпитальной ТЛТ связана с невозможностью выполнить первичные ЧКВ в связи с занятостью ангиографической операционной – 9 случаев (ТЛТ в 8 наблюдениях фортелизином и 1 металлизе). Одна больная 75 лет категорически отказалась от инвазивных вмешательств (ТЛТ стрептокиназой). У другой пациентки в анамнезе аллергическая реакция на контрастное вещество (ТЛТ металлизе).

В одном наблюдении госпитальный тромболизис назначен больной с ОКС с подъемом сегмента ST, осложненным тяжелым отеком легких (ТЛТ металлизе). Оценить эффективность тромболизиса в данном случае затруднительно, поскольку течение заболевания имело исходно злокачественно прогрессирующее течение без эффекта от проводимой интенсивной терапии. По истечении 1 ч пребывания в стационаре констатирована смерть больной. Аутопсия не проводилась.

В 11 из 12 случаев ТЛТ, выполненная на госпитальном этапе, оказалась эффективной. В двух наблюдениях это подтверждено клиническими и электрокардиографическими данными. У девяти пациентов проводились ангиографические исследования, по данным которых в инфаркт-ответственных коронарных артериях устанавливался кровоток ТИМІ 2-3. В восьми случаях успешно выполнены ЧКВ с хорошими клиническими результатами (все больные были выписаны на амбулаторное долечивание в удовлетворительном состоянии с сохраненной сократительной способностью миокарда). В одном наблюдении после тромболизиса металлизе по данным коронароангиографии установлено многососудистое и диффузное поражение коронарных артерий, в связи с чем пациентка была направлена на коронарное шунтирование. Осложнений (в том числе геморрагических), ассоциированных с ТЛТ, не отмечалось.

В восьми случаях госпитальная ТЛТ проводилась российским фибринселективным тромболитиком фортелизин® (рекомбинантный белок, содержащий аминокислотную последовательность стафилокиназы) по схеме 10 мг болюсом и 5 мг внутривенно капельно в течение 30 мин в условиях реанимационного отделения. Данный препарат в НУЗ ДКБ применяется с 2014 г. Обстоятельства назначения у всех пациентов носили схожий характер – больные со значимыми ишемическими повреждениями миокарда без догоспитальной ТЛТ в сроки обращения 2–5 ч от начала заболевания с потребностью в экстренных первичных ЧКВ, недоступных по причине занятости рентгеноперационной. На рисунке представлены коронарограммы одного из таких пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ

При оказании специализированной медицинской помощи в ЧКВ-центре с круглосуточным потоком urgentных больных с ишемическими повреждениями миокарда неизбежны ситуации, когда необходимо проводить госпитальную ТЛТ. В 2014 г. в НУЗ ДКБ такая потребность возникла в 12 случаях, что составило 1,9 % от общего количества ОИМ, прошедших за год.

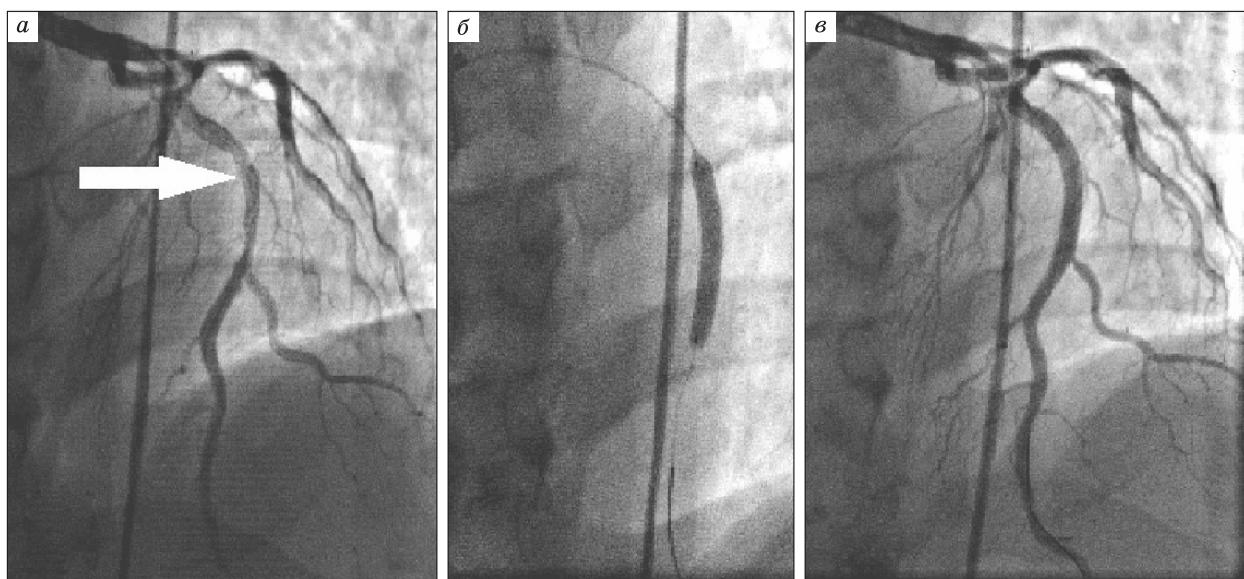


Рис. Коронарограммы пациента С., 51 года: а – вид коронарной артерии после ТЛТ, стрелкой указан сегмент передней нисходящей ветви левой коронарной артерии со стенозами 50–60 %, с пристеночным тромбозом и кровотоком ТИМІ2-3; б – этап имплантации стента; в – коронарная артерия после ЧКВ с полноценным восстановлением просвета

В настоящее время госпитальная ТЛТ нами рассматривается исключительно как вынужденная мера, обусловленная простыми обстоятельствами (отказ пациента от коронарных интервенций или аллергия на контраст) или высокой загруженностью ангиографической операционной при интенсивном потоке больных. Такой строгий подход связан с несколькими причинами.

Во-первых, введение тромболитического препарата на любом уровне (догоспитальном или госпитальном) потенциально увеличивает риск геморрагических осложнений. Во-вторых, в соответствии с клиническими рекомендациями [6, 7] этим пациентам в любом случае необходимо будет проводить коронароангиографию с возможным ЧКВ. В этой ситуации увеличиваются расходы медицинской организации на специализированную медицинскую помощь. В условиях оптимизации затрат на дорогостоящее лечение больного с острой коронарной патологией, а также тренда на импортзамещающие технологии у нас возник практический интерес к российскому фибринселективному тромболитическому средству фортелизин®.

Применение данного препарата в НУЗ ДКБ сопровождалось 100%-й эффективностью, подтвержденной клиническими, электрокардиографическими и ангиографическими данными. Несмотря на то что группа состояла всего из восьми человек, фортелизин® оставил позитивное впе-

чатление, и у нас есть планы по его дальнейшему использованию.

На примере нашей клиники четко прослеживается тенденция уменьшения количества системных тромболизисов, проведенных скорой медицинской помощью и в стационаре. Общая доля пациентов с ОИМ, которые перенесли ТЛТ, в 2012 г. составила 27,7 %, в 2013 г. – 24,1 %, в 2014 г. – 17,4 %. Аналогичный показатель по догоспитальным системным тромболизисам: 2012 г. – 20,1 %, 2013 г. – 20,0 %, 2014 г. – 15,5 %. На уровне НУЗ ДКБ: 2012 г. – 7,6 %, 2013 г. – 4,1 %, 2014 г. – 1,9 %. Применительно к НУЗ ДКБ в динамике 2012–2014 гг. уменьшилась доля пациентов с ОИМ, которым проводилась реперфузионная терапия только в объеме ТЛТ: 2012 г. – 11,7 %, 2013 г. – 6,7 % и 2014 г. – 5,6 %.

Наблюдаемая нами ситуация по ТЛТ свидетельствует в пользу более рационального применения данного вида реперфузионной терапии в период действия «Региональной программы специализированной медицинской помощи при ОКС». Повсеместное внедрение общепринятой временной стратегии по проведению реперфузионных вмешательств среди больных с острой ишемией миокарда способствовало проведению тромболизисов только в тех случаях, когда в этом была клиническая потребность. Представленные данные по госпитальной ТЛТ в НУЗ ДКБ в 2014 г. также подтверждают это положение.

Второй этап оптимизации ТЛТ на догоспитальном и стационарном уровнях связан с поиском новых эффективных, безопасных и удобных для применения фибринолитических средств. Появление российского препарата фортелизин® может способствовать решению этой клинической задачи [5, 8]. Наши данные ограничены и не предполагают далеко идущих выводов. Дальнейшее накопление клинического опыта по фибринолитическому препарату фортелизин®, особенно на этапе скорой медицинской помощи, на который приходится основное назначение ТЛТ, позволит определить место этого средства в клинической практике. Бесспорно, у фортелизина® есть перспективы широкого применения, поскольку он включен в обновленный перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2015 г. (распоряжение Правительства РФ от 30.12.2014 г. № 2782-р).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ЧКВ-технологии в лечении экстренных коронарных состояний являются приоритетом большинства российских программ специализированной медицинской помощи при острой ишемии миокарда. Несмотря на их высокую клиническую эффективность, тромболитическая терапия всегда будет востребованной. Это прежде всего касается случаев транспортировки больных с ОКС из отдаленных районов. Такая потребность будет возникать и в региональном сосудистом центре в случаях одновременного поступления нескольких пациентов, нуждающихся в ЧКВ. Поэтому поиск новых решений для оптимизации тромболитической реперфузионной терапии будет постоянным.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокерия Л.А. Здоровье России: Атлас. М., 2013. 420 с.
2. Бокерия Л.А., Алекян Б.Г. Рентгенэндоваскулярная диагностика и лечение заболеваний сердца и сосудов в Российской Федерации. М., 2013. 172 с.
3. Государственная программа Российской Федерации «Развитие здравоохранения». Распоряжение Правительства Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 2511-р г. Москва // Собрание законодательства РФ. 2012. (53). Ст. 8019.
4. Доклад о состоянии здоровья населения и организации здравоохранения по итогам деятельности органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации за 2013 год. http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/doklad_2013.
5. Марков В.А., Вышков Е.В., Карпов Р.С. Коронарная реперфузия при инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST: проблемы и решения // Рос. кардиол. журн. 2015. (1) 53–58.
6. Национальные рекомендации по диагностике и лечению больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST ЭКГ // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2007. (8). 1–64.
7. Рекомендации Европейского общества кардиологов и Европейской ассоциации кардиоторакальных хирургов по реваскуляризации миокарда 2014 // Рос. кардиол. журн. 2015. (2). 5–81.
8. Сидельников А.В., Чернышева И.Е., Колединский А.Г. Сравнительный анализ эффективности применения тромболитических препаратов: поиск продолжается // Междунар. журн. интервенционной кардиоангиологии. 2014. (39). 48–56.
9. Чазов Е.И., Бойцов С.А. Оказание медицинской помощи больным с острым коронарным синдромом в рамках программы создания региональных и первичных сосудистых центров в Российской Федерации // Кардиол. вестн. 2008. (2). 5–11.
10. Keeley E.C., Boura J.A., Grines C.L. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction a quantitative review of 23 randomized trials // Lancet. 2003. 361. 13–20.

THE EXPERIENCE OF HOSPITAL THROMBOLYTIC THERAPY OF ST-SEGMENT ELEVATION MYOCARDIAL INFARCTION IN REGIONAL VASCULAR CENTER

Konstantin Aleksandrovich KIREEV, Aleksandr Valerevich KRASNOPEEV

*Railway Clinical Hospital on the Station of Chelyabinsk, Joint Stock Company «Russian Railways»
454048, Chelyabinsk, Dovator str., 23*

Objective. The analysis of some cases of hospital thrombolytic therapy in the regional vascular center. Material and methods. The capacity of reperfusion therapy in 2014, including hospital pharmacological therapy, is presented. Results. 436 (67.9 %) patients have had reperfusion therapy: percutaneous coronary interventions (PCI) in isolation – 326 (50.8 %), only thrombolytic therapy – 36 (5.6 %), pharmaco-invasive method – 74 (11.5 %). Thrombolytic therapy was performed in 110 (17.1 %) cases, 98 (15.2 %) from them - by ambulance teams. The need for hospital thrombolytic therapy occurred in 12 cases (1.9 %). In 9 cases, the main reason was impossibility to do primary PCI due to the occupancy of the room for angiography. In 8 cases thrombolytic therapy was performed by a recombinant protein containing the amino acid sequence of staphylokinase (Fortelyzin®), and it was effective. All patients have had successful PCI. Conclusions. In conditions of our regional vascular centre, we used thrombolytic therapy as a forced measure due to simple circumstances (the patient's refusal of coronary interventions or allergic to contrast) or high occupancy of the angiographic operating room. The results of the administration of Russian thrombolytic agent Fortelyzin® have left a positive impression. Further accumulation of experience will determine the place of this medication in clinical practice.

Key words: hospital thrombolytic therapy, percutaneous coronary intervention, the Regional Vascular Center, reperfusion therapy, acute myocardial infarction.

*Kireev K.A. – candidate of medical sciences, endovascular physician for diagnosis and treatment of department of endovascular diagnostic and treatment methods, e-mail: kkireev83@mail.ru
Krasnopeev A.V. – physician-resuscitator of department of anesthesiology and intensive care, e-mail: lead_guitar@mai.ru*

ФЕНОМЕН ЛЕПТИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ЛИЦ С ГАСТРОЭЗОФАГАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНЬЮ И РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ОЖИРЕНИЯ

Мария Анатольевна ЛИВЗАН, Ирина Владимировна ЛАПТЕВА,
Татьяна Сергеевна КРОЛЕВЕЦ

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

Цель исследования – выявление особенностей течения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) на основании изучения клинических и эндоскопических проявлений заболевания, данных суточной рН-метрии и феномена лептинорезистентности у лиц с различными типами ожирения. **Материал и методы.** Обследовано 105 пациентов ГЭРБ с ожирением или избытком массы тела. Выполнена оценка антропометрических показателей, результатов биохимического анализа крови, эзофагодуоденоскопии, рН-метрии, содержания лептина и его рецепторов. Пациенты были распределены в основную группу (с абдоминальным типом ожирения, $n = 85$) и группу сравнения (с нормальными показателями объема талии, $n = 20$). **Результаты.** Масса тела, рост, индекс массы тела, уровень глюкозы были достоверно выше в основной группе ($p < 0,00003$, $p < 0,03$, $p < 0,00001$, $p < 0,02$ соответственно). Лица с абдоминальным типом ожирения имели более высокое содержание лептина и более низкий уровень рецепторов к нему (медиана содержания лептина 36,93 (14,69–47,60) и 9,59 (7,66–19,48) в основной группе и группе сравнения соответственно, медиана содержания рецепторов к лептину 18,25 (14,69–24,26) и 23,78 (18,83–32,67) соответственно). Данные показатели в этой группе имели между собой отрицательную связь умеренной силы ($r_s = -0,424$, $p < 0,002$). У лиц с абдоминальным ожирением были более высокими значения рН кардиального отдела и тела желудка ($p < 0,04$, $p < 0,02$ соответственно), а время контакта рефлюксата с низкими рН ($pH < 4$) в указанных отделах было продолжительнее в группе сравнения ($p < 0,05$). Выявлены положительные взаимосвязи уровня рецепторов к лептину с временными показателями в основной группе: временем контакта рН в диапазоне от 3 до 6 в теле желудка ($r_s = 0,645$, $p < 0,03$), в диапазоне от 4 до 7 и менее 4 в пищеводе ($r_s = 0,645$, $p < 0,03$; $r_s = 0,600$, $p < 0,05$ соответственно), самыми длительными гастроэзофагеальными ($r_s = 0,624$, $p < 0,03$) и щелочными рефлюксами ($r_s = 0,640$, $p < 0,03$). **Заключение.** Формирование лептинорезистентности у лиц с избыточной массой тела и ожирением с учетом типа распределения жировой ткани ассоциировано с особенностями течения ГЭРБ.

Ключевые слова: абдоминальный тип ожирения, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, лептин, лептинорезистентность.

На фоне устойчивой тенденции к нарастанию распространенности среди населения избыточной массы тела и ожирения [21] в России и в мире последние годы отмечается рост заболеваемости гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ) [13], в том числе осложненных форм заболевания (прежде всего, пищевода Барретта и ассоциированной с ним аденокарциномы пищевода [14]). Избыточная масса тела и ожирение признаны независимыми факторами риска как возникновения, так и прогрессирования ГЭРБ [15].

Высокая распространенность ГЭРБ среди лиц с ожирением отчасти может быть объяснена ме-

ханическими причинами. Так, известно, что ожирение способствует повышению внутрижелудочного давления и сопровождается более высоким риском формирования грыжи пищеводного отверстия диафрагмы и манифестации ГЭРБ. Также увеличивается частота и продолжительность спонтанных релаксаций нижнего пищеводного сфинктера как основного патогенетического механизма ГЭРБ, даже при отсутствии диафрагмальных грыж, неэрозивной ГЭРБ и рефлюкс-эзофагита [7, 8]. В связи с этим представляется актуальным изучение других факторов, участвующих в формировании ГЭРБ и ее прогрессировании.

Ливзан М.А. – д.м.н., зав. кафедрой факультетской терапии с курсом профессиональных болезней, проректор по НИР

Лаптева И.В. – аспирант кафедры факультетской терапии

Кролевец Т.С. – аспирант кафедры факультетской терапии, e-mail: mts-8-90@mail.ru

Известно, что продуцируемые висцеральной жировой тканью биологически активные вещества (адипокины) оказывают влияние на пищевое поведение [19]. К числу одних из ключевых адипокинов относится лептин, который действует на центры голода и насыщения в гипоталамусе, участвует в мозговой регуляции энергетического гомеостаза и контролирует массу тела путем снижения синтеза и высвобождения нейропептида Y, вызывающего чувство голода [9]. Помимо этого влияние лептина на регуляцию аппетита может быть связано с его прямым воздействием на вкусовые рецепторы. Считается, что лептин является связующим звеном между адипоцитами и β -клетками поджелудочной железы и стимулирует секрецию инсулина при снижении к нему чувствительности [20]. В настоящее время известно, что лептин играет роль в формировании эрозивных форм ГЭРБ, пищевода Барретта, что может быть связано с его провоспалительной активностью, повышением пролиферативного потенциала пищевода эпителия за счет индукции эпидермального фактора роста, а также антиапоптотическим действием [5, 17].

Целью нашего исследования стало выявление особенностей течения ГЭРБ на основании изучения клинических и эндоскопических проявлений заболевания, данных суточной рН-метрии и феномена лептинорезистентности у лиц с различными типами ожирения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с поставленной целью нами проведено открытое сравнительное исследование методом поперечного среза с формированием группы из 105 пациентов ГЭРБ с ожирением или избыточной массой тела.

Критерии включения в исследования были следующими: возраст 18–70 лет; наличие ГЭРБ с пищеводными симптомами заболевания согласно Монреальскому соглашению 2006 г. [16], наличие ожирения или избыточной массы тела, рассчитываемой по индексу массы тела, согласно критериям ВОЗ, наличие информированного согласия. Критерии исключения: злокачественное новообразование пищевода или желудка, осложненное течение ГЭРБ, беременность и кормление грудью, терминальная стадия любого заболевания, прием препаратов, влияющих на уровень кислотной продукции, без назначения врача-исследователя.

Всем включенным в исследование осуществлялся сбор жалоб, анамнеза с подробным расспросом об образе жизни, лекарственном анамнезе, наличии заболеваний, ассоциированных с

метаболическим синдромом. Проводились обследования, включавшие общеклинические (антропометрия с подсчетом индекса массы тела (ИМТ), измерения объема талии (ОТ) и бедер (ОБ) и подсчетом отношения ОТ к ОБ, физикальный осмотр), лабораторные (общие анализы крови и мочи, определение содержания глюкозы в плазме крови натощак, уровня общего белка, билирубина, активности АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, содержание общего холестерина и его фракций) и инструментальные (эзофагогастродуоденоскопия, суточная рН-метрия, УЗИ абдоминальное) методы. Также в сыворотке крови всех обследованных определялся уровень лептина и растворимых рецепторов к лептину на базе центральной научно-исследовательской лаборатории при Омском государственном медицинском университете (заведующий Д.Г. Новиков). Исследуемые показатели определялись методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител, специфичных к лептину и рецепторам лептина. Оценка результатов производилась с помощью планшетного фотометра IMark (Bio-Rad, США).

Обработка результатов исследования и графический анализ данных проводились на основании рекомендаций ведущих авторов в области статистической обработки данных [3, 6, 21]. Ввиду того что распределение показателей в группах было отличным от нормального, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Сравнение выборок проводили при помощи непараметрических критериев Манна–Уитни и χ^2 . Взаимосвязи между показателями оценивались при помощи корреляционного анализа Спирмена (r_s). На всех этапах статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемая группа пациентов ($n = 105$) была представлена лицами мужского ($n = 19$) и преимущественно женского пола среднего и пожилого возраста (медиана возраста составила 58 лет, верхний и нижний квартили – соответственно 50 и 63 года). Подсчет ИМТ показал, что большинство обследованных лиц (74, или 70,5 %) были больны ожирением (медиана ИМТ составила 32,8 кг/м², верхний и нижний квартили – соответственно 29,0 и 35,4 кг/м²). При этом около 56,8 % человек имели ожирение 1 степени, 31,1 % и 12,2 % – ожирение соответственно 2 и 3 степени, 31 обследованный (29,5 %) имел избыточную массу тела.

Бесспорно, индекс массы тела (ИМТ) представляет собой простой, легко воспроизводимый, надежный скрининговый критерий для оценки нормальной, избыточной массы тела и ожирения. В то же время исследования последних лет показывают, что ИМТ не является достаточным критерием для прогнозирования развития и течения всех заболеваний, ассоциированных с ожирением и избытком массы тела. Это нашло отражение на 23-м ежегодном научном конгрессе в 2014 г., где Американская ассоциация эндокринологов рассмотрела новый алгоритм диагностики ожирения, который включает в себя два компонента: а) оценку ИМТ с коррекцией на этнические особенности для выявления лиц с повышенным количеством жировой ткани, а также особенности распределения жировой ткани и б) наличие и тяжесть осложнений, связанных с ожирением. Предлагается даже рассмотреть возможность изменения самого термина «ожирение» (например – хроническое заболевание жировой ткани – «adiposity-based chronic disease» (ABCD). Таким образом, сегодня отмечается переход от оценки ожирения на основе ИМТ («ИМТ-ориентированный подход») к оценке ожирения на основе наличия или отсутствия связанных с ожирением заболеваний или болезненных состояний («подход, ориентированный на осложнения»). К этим заболеваниям в том числе была отнесена ГЭРБ, а к ее осложненным формам – эрозивное поражение пищевода и пищевод Баррета [11].

В связи с этим в соответствии с дизайном исследования по результатам измерения ОТ и ОБ и подсчета показателя ОТ/ОБ группа пациентов ГЭРБ с ожирением или избытком массы тела была разделена на основную группу ($n = 85$), лица с абдоминальным типом ожирения, и группу сравнения ($n = 20$), в которую вошли люди с нормальной величиной ОТ.

Общие характеристики основной группы и группы сравнения представлены в табл. 1. В ос-

новной группе, в большей степени состоявшей из женщин ($p < 0,05$), выявлялись достоверно более высокие значения веса, роста, ИМТ. Имелись различия между группами по возрасту: пациенты с абдоминальным ожирением были достоверно старше лиц с нормальными значениями ОТ.

На момент включения в исследование, в соответствии с критериями, все пациенты предъявляли жалобы, характерные для ГЭРБ. Изжогу днем отмечали все 105 пациентов, изжогу ночью – 95 человек (90,5 %). На кислотную регургитацию (ощущение кислоты во рту) предъявляли жалобы 103 (98,1 %) пациента, регургитацию горьким – 69 (65,7 %), ретростеральную боль – 12 (11,4 %), дисфагию – 5 (4,8 %), эпигастральную боль в виде жжения отмечали 103 (98,1 %) человека. При сравнении частоты и выраженности симптомов ГЭРБ между группами различий выявлено не было.

При анализе других клинических симптомов, не относящихся к проявлениям ГЭРБ, но стандартно опрашиваемых у страдающих заболеваниями органов пищеварения пациентов, установлено, что лица основной группы с абдоминальным типом ожирения чаще, чем обследованные пациенты группы сравнения (62 (72,9 %) и 9 (45 %) человек соответственно, $p < 0,02$), предъявляли жалобы на боль билиарного характера (схваткообразная боль, локализованная в области правого подреберья, усиливающаяся после приема жирной, жареной пищи). Наличие дискомфорта, боли билиарного типа говорит о более высокой распространенности патологии желчевыводящих путей у пациентов основной группы в сравнении с лицами с нормальным типом распределения жировой ткани. Это предположение основывается на результатах исследований, установивших, что формирование желчно-каменной болезни у женщин без традиционно оцениваемого ожирения обусловлено нарушением распределения жировой ткани с преимущественной аккумуляцией

Таблица 1

Общие характеристики групп

Показатель	Основная группа ($n = 85$)			Группа сравнения ($n = 20$)			p
	P50	P25	P75	P50	P25	P75	
Количество мужчин	9 (10,6 %)			10 (50 %)			$< 0,05$
Возраст, лет	59,00	52,00	63,00	52,50	42,50	59,00	0,048
Стаж болезни, лет	4,00	3,00	7,00	4,00	2,50	6,50	$> 0,05$
Вес, кг	90,00	84,00	98,00	75,00	72,00	87,50	0,00003
Рост, см	164,00	159,00	168,00	165,50	163,00	176,00	0,03
ИМТ, кг/м ²	33,66	31,25	36,00	27,07	26,31	28,43	$< 0,00001$

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 P50 – медиана, P25 – верхний квартиль, P75 – нижний квартиль, p – статистическая значимость различий.

Таблица 2

Данные лабораторных методов исследования

Показатель	Основная группа (n = 85)			Группа сравнения (n = 20)			p
	P50	P25	P75	P50	P25	P75	
Содержание общего белка, г/л	74,00	70,00	79,00	72,00	68,00	78,00	> 0,05
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	8,29	8,17	8,42	8,34	8,23	8,43	> 0,05
Активность АлАТ, Ед/л	30,00	21,00	40,00	35,50	25,50	45,50	> 0,05
Активность АсАТ, Ед/л	34,00	28,00	45,00	33,50	27,00	45,00	> 0,05
Активность щелочной фосфатазы, Ед/л	239,00	200,50	294,50	215,50	171,65	255,00	> 0,05
Активность гамма-глутамилтранспептидазы, Ед/л	29,50	15,15	46,50	29,00	22,50	46,50	> 0,05
Содержание глюкозы, ммоль/л	5,18	4,83	5,77	4,60	4,47	5,36	0,02
Содержание липопротеидов низкой плотности, ммоль/л	5,50	4,60	6,45	5,50	4,27	6,80	> 0,05
Содержание липопротеидов высокой плотности, ммоль/л	1,29	0,90	1,80	1,20	0,98	1,72	> 0,05
Содержание триглицеридов, ммоль/л	1,70	1,21	2,10	1,75	1,02	2,10	> 0,05

в висцеральных интраабдоминальных жировых депо. Установлено, что у этой категории пациентов имеют место относительная базальная гипертинурия, признаки инсулинорезистентности, а также нарушение инсулиновой реакции на прием экзогенного жира [18]. Это представляется весьма интересным и может являться отдельной темой для изучения.

При анализе различий между группами по частоте встречаемости заболеваний, ассоциированных с ожирением и повышенной массой тела, обнаружены достоверные различия между группами по наличию неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), которая встречалась у 82,3 % больных в группе с абдоминальным типом ожирения и у 35 % лиц с нормальным распределением жировой ткани ($p < 0,001$). При этом в основной группе на момент обследования у 40 % пациентов была выявлена НАЖБП в стадии стеатоза, а 60 % пациентов имели стеатогепатит с клинико-биохимической активностью синдрома цитолиза 1–2 степени и холестаза 1 степени. Полученные результаты представляются весьма интересными, учитывая, что исследования последних лет показывают связь наличия НАЖБП с повышенным риском ГЭРБ, независимо от сопутствующего ожирения [1].

При сравнении данных лабораторных методов исследования установлено, что лица с абдоминальным ожирением имели достоверно более высокое содержание глюкозы в крови (табл. 2), что, как известно, является одним из проявлений метаболического синдрома.

По результатам проведения эндоскопии верхних отделов пищеварительного тракта незрозив-

ная форма ГЭРБ диагностирована у 92 (87,6 %) пациентов, у 13 (12,4 %) человек выявлена эрозивная форма заболевания. При анализе эндоскопических проявлений ГЭРБ у пациентов групп сравнения различий выявлено не было.

Для оценки кислотопродуцирующей функции желудка, частоты и продолжительности гастроэзофагеальных рефлюксов проведена суточная рН-метрия (табл. 3). Анализ полученных данных показал, что в основной группе выявлялись достоверно более высокие значения рН кардиального отдела и тела желудка, что может указывать на высокую частоту дуоденогастральных рефлюксов и, соответственно, рефрактерность к проводимой терапии ингибиторами протонной помпы у данной категории пациентов [10]. По времени же контакт рефлюксата с более низкими значениями рН ($pH < 4,0$) в указанных отделах был продолжительнее в группе сравнения.

Результаты анализа содержания одного из ключевых адипокинов – лептина и его растворимых рецепторов у пациентов с различными типами ожирения, страдающих ГЭРБ, представлены в табл. 4. Уровень лептина был достоверно выше в группе пациентов с абдоминальным типом ожирения, что согласуется с известными литературными данными об увеличении гормональной продукции адипоцитами при увеличении массы висцеральной жировой ткани [12]. Объем жировой ткани и пол человека – основные факторы, определяющие экспрессию гена лептина [2]. Интересно, что увеличение содержания лептина происходит при одновременном снижении уровня рецепторов к нему, т.е. у пациентов, страдающих ожирением по абдоминальному типу, фор-

Таблица 3

Показатели рН-метрии

Показатель	Основная группа (n = 85)			Группа сравнения (n = 20)			p
	P50	P25	P75	P50	P25	P75	
Тело желудка							
Минимальное значение рН	0,8	0,6	0,9	0,8	0,3	1,0	> 0,05
Максимальное значение рН	7,9	7,7	8,5	7,2	6,8	8,5	> 0,05
Индекс агрессивности рН	3,3	3,0	4,5	2,8	2,2	3,6	0,04
Среднее значение рН	2,9	2,7	4,1	2,5	2,0	3,3	0,02
Разброс рН	1,8	1,4	2,1	1,4	1,0	1,5	0,05
Время с рН < 4,0	0,7	0,5	0,8	0,9	0,6	0,9	0,05
Кардия							
Минимальное значение рН	0,8	0,4	1,2	0,9	0,6	1,1	> 0,05
Максимальное значение рН	7,8	7,6	8,7	8,3	7,4	8,8	> 0,05
Индекс агрессивности рН	3,7	3,4	4,5	3,6	3,0	5,6	> 0,05
Среднее значение рН	3,1	3,0	4,1	3,2	2,6	5,5	> 0,05
Разброс рН	1,7	1,6	2,0	1,4	1,2	1,8	0,02
Время с рН в диапазоне от 2,0 до 4,0	110,5	106,5	113,5	108,0	103,0	117,0	> 0,05
Индекс соотношения кардия/тело	1,0	0,8	1,2	1,3	1,0	1,5	> 0,05
Пищевод							
Минимальное значение рН	1,2	0,9	1,6	1,4	0,8	1,4	> 0,05
Максимальное значение рН	8,4	8,3	8,7	8,5	7,9	8,6	> 0,05
Индекс агрессивности рН	6,3	4,8	6,7	5,8	4,9	6,3	> 0,05
Среднее значение рН	6,1	4,5	6,7	5,7	4,5	6,2	> 0,05
Разброс рН	1,3	1,0	1,9	1,0	0,9	1,9	> 0,05
Время с рН < 4,0	110,0	105,0	113,0	108,0	103,0	117,0	> 0,05
Число эпизодов ГЭР	180,0	50,0	239,0	149,0	81,0	486,0	> 0,05
Число эпизодов ГЭР длительностью более 5 мин	5,0	1,0	13,0	3,0	1,0	26,0	> 0,05
Самый длительный эпизод ГЭР, мин	111,0	107,0	114,0	109,0	103,0	118,0	> 0,05

Таблица 4

Содержание лептина и его растворимого рецептора

Показатель	Основная группа (n = 85)			Группа сравнения (n = 20)			p
	P50	P25	P75	P50	P25	P75	
Содержание лептина, нг/мл	36,93	14,69	47,60	9,59	7,66	19,48	0,02
Содержание рецептора лептина, нг/мл	18,25	14,60	24,26	23,78	18,83	32,67	0,02
Отношение содержания лептина к содержанию рецептора лептина	1,76	0,83	3,25	0,43	0,26	0,84	0,009

мируется феномен лептинорезистентности, что согласуется с известными литературными данными [4].

Учитывая полученные результаты, нами проведен корреляционный анализ между показателями лептина и его растворимых рецепторов в группах с ГЭРБ и разными типами ожирения, а также по всей группе в целом. Обнаружены достоверно значимые отрицательные связи умеренной силы в группе пациентов с ГЭРБ и ожирением в целом, а также в группе с ГЭРБ и абдоминальным типом ожирения ($r_s = -0,451$, $p < 0,0004$ и $r_s = -0,424$,

$p < 0,002$ соответственно), тогда как в группе с нормальным типом подобных взаимосвязей обнаружено не было (см. рисунок).

При проведении корреляционного анализа найдена отрицательная связь умеренной силы между величиной ОТ и содержанием растворимых рецепторов к лептину ($r_s = -0,451$, $p < 0,0004$). Данная находка позволяет нам предположить, что у лиц с абдоминальным типом ожирения в механизме формирования лептинорезистентности нехватка рецепторов к лептину преобладает над его избыточной продукцией адипоцитами. При оцен-

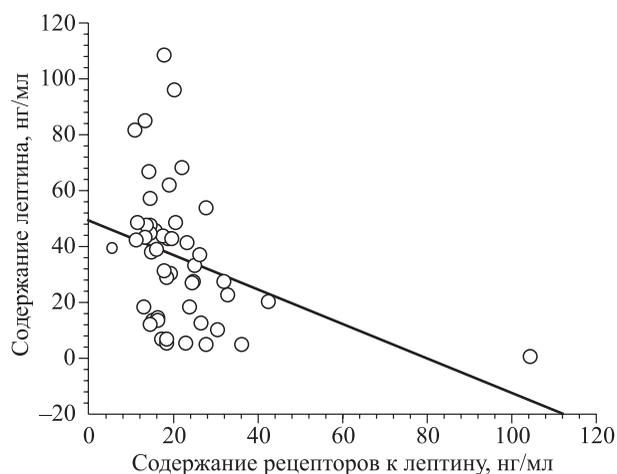


Рис. Взаимосвязь между содержанием лептина и его растворимого рецептора у пациентов с ГЭРБ и абдоминальным типом ожирения ($r_s = -0,424$, $p < 0,002$)

ке выраженности симптомов ГЭРБ в зависимости от уровня лептина и его растворимых рецепторов у лиц, страдающих ожирением, с учетом характера распределения жировой ткани, нами выявлены достоверно значимые корреляционные связи только в группе сравнения: сильная отрицательная связь между содержанием рецепторов к лептину и интенсивностью эпигастральной боли ($r_s = -0,866$, $p < 0,01$).

Учитывая наличие лептинорезистентности у лиц с абдоминальным типом ожирения, представлялось интересным выявление взаимосвязей уровня гормона и его рецепторов с показателями рН-метрии в данной группе. Обнаружены положительные значимые корреляционные связи содержания рецепторов к лептину с рядом временных показателей: временем контакта рН в диапазоне от 3,0 до 6,0 в теле желудка ($r_s = 0,645$, $p < 0,03$), в диапазоне от 4,0 до 7,0 и менее 4,0 в пищеводе ($r_s = 0,645$, $p < 0,03$ и $r_s = 0,600$, $p < 0,05$ соответственно), а также самым длительным гастроэзофагеальным рефлюксом ($r_s = 0,624$, $p < 0,03$), самым длительным щелочным рефлюксом ($r_s = 0,640$, $p < 0,03$). Таким образом, влияние феномена лептинорезистентности на формирование осложненных форм ГЭРБ, по данным нашего исследования, может быть обусловлено увеличением времени контакта рефлюксата с эпителием пищевода вне зависимости от его состава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, формирование лептинорезистентности у лиц с избыточной массой тела и ожирением с учетом типа распределения жировой ткани ассоциировано с особенностями течения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни,

что делает актуальным изучение роли гормонов пищевого поведения в формировании заболева- ний пищеварительного тракта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева О.Д., Баженова Е.А., Березина А.В. и др. Уровень лептина и Q223R полиморфизм гена рецептора лептина у пациентов с абдоминальным ожирением // Проблемы женского здоровья. 2010. 5. (2). 28–34.
2. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. СПб.: Питер, 2001. 656 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
4. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. СПб.: Фолиант, 2003. 432 с.
5. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Корнеева О.Н. Клинические варианты метаболического синдрома. М.: Мед. информ. агентство, 2011. 220 с.
6. Лазебник Л.Б., Звенигородская Л.А. Метаболический синдром и органы пищеварения. М.: Анахарсис, 2009. 184 с.
7. Ливзан М.А., Кононов А.В. Клинические и фармакоэкономические аспекты антисекреторной терапии гастроэзофагеальной рефлюксной болезни // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. 2004. (4). 55–60.
8. Ливзан М.А., Лантева И.В., Лялюкова Е.А. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь: особенности течения у лиц с метаболическим синдромом // Мед. совет. 2014. (13). 10–12.
9. Ливзан М.А., Лантева И.В., Миллер Т.С. Роль лептина и лептинорезистентности в формировании неалкогольной жировой болезни печени у лиц с ожирением и избыточной массой тела // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. 2014. (8). 27–33.
10. Поляруш Н.А., Дворяшина И.В., Мочалов А.А., Феликсова И.В. Постпрандиальная липемия и инсулинемия у женщин с ожирением и желчно-каменной болезнью // Пробл. эндокринологии. 2006. 52. (6). 26–30.
11. Рощина Т.В. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь // Рус. мед. журн. 2000. (2). 5–7.
12. Самородская И.В. Новая парадигма ожирения // Лечащий врач. 2014. (12). 10–15.
13. Чубенко Е.А., Беляева О.Д., Беркович О.А., Баранова Е.И. Лептин и метаболический синдром // Рос. физиол. журн. 2010. 96. (10). 945–965.
14. Bray G., Ryan D. Drug treatment of the overweight patient // Gastroenterology. 2007. 132. 2239–2252.
15. Drahos J., Ricker W., Parsons R. et al. Metabolic syndrome increases risk of Barrett esophagus in the absence of gastroesophageal reflux: An analysis of SEER-medicare data // J. Clin. Gastroenterol. 2015. 49. (4). 282–288.

16. Garcia J.M., Splenser A.E., Kramer J. et al. Circulating inflammatory cytokines and adipokines are associated with increased risk of Barrett's esophagus: a case-control study // Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2014. 12. (2). 229–238.
17. Miele L., Cammarota G., Vero V., Racco S. et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with high prevalence of gastro-oesophageal reflux symptoms // Dig. Liver Dis. 2012. 44. (12). 1032–1036.
18. Obesity. World Gastroenterology Organization Global Guideline. 2009. <http://www.worldgastroenterology.org/obesity.html>.
19. Rubenstein J.H., Morgenstern H., McConell D. Associations of diabetes mellitus, insulin, leptin, and ghrelin with gastroesophageal reflux and Barrett's esophagus // Gastroenterology. 2013. 145. (6). 1237–1244.
20. Vakil N., van Zanten S.V., Kahrilas P. et al. Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus // Am. J. Gastroenterol. 2006. 101. 1900–1920.
21. Watanabe S., Hojo M., Nagahara A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases // J. Gastroenterol. 2007. 42. (4). 267–274

THE PHENOMENON OF LEPTINRESISTANCE IN PATIENTS WITH GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE AND DIFFERENT TYPES OF OBESITY

Maria Anatol'evna LIVZAN, Irina Vladimirovna LAPTEVA, Tatyana Sergeevna KROLEVETS

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

Aim: to determine the characteristics of the course of gastroesophageal reflux disease (GERD) based on the study of clinical and endoscopic manifestations of the disease, results of pH monitoring and the phenomenon of leptinresistance in patients with different types of obesity. *Methods:* 105 patients with GERD and obesity or overweight have been examined. We asked patients, assessed an anthropometric indices, did a biochemical analysis of blood, endoscope examination of the esophagus and stomach, pH monitoring, assessed levels leptin and its soluble receptor. We separated patients in two groups: the main group ($n = 85$) – patients with abdominal type of obesity, the comparison group ($n = 20$) – with normal volum of waist. Results: Weight, height, body mass index, level of glucose was higher in main group ($p < 0.00003$, $p < 0.03$, $p < 0.10$), 82 , $p < 0.02$, respectively). Leptin levels in patients with abdominal type of obesity were significantly higher and the level of its receptors was significantly lower (mediana of leptin levels 36.93 (14.69–47.60) in main group versus 9.59 (7.66–19.48), mediana of leptin's receptors 18.25 (14.69–24.26) versus 23.78 (18.83–32.67), respectively). Between these indicators in main group was revealed negative correlation of mild strength ($r_s = -0.424$), $p < 0.002$). In group with abdominal type of obesity pH cardia and body of stomach was higher ($p < 0.04$, $p < 0.02$, respectively), but time of refluxate's contact with low pH ($pH < 4$) in these departments was longer in the comparison group ($p < 0.05$). Positive relationship was found between leptin's receptors and contact's time in the range of pH from 3 till 6 in the stomach ($r_s = 0.645$), $p < 0.03$), in the range from 4 till 7 and less than 4 in the esophagus ($r_s = 0.645$), $p < 0.03$, $r_s = 0.600$), $p < 0.05$, respectively), the longest gastroesophageal ($r_s = 0.624$), $p < 0.03$) and alkaline refluxes ($r_s = 0.640$), $p < 0.03$). Conclusions: the formation of leptinresistance in individuals with overweight and obesity based on the type of fat distribution is associated with course of the GERD.

Key words: abdominal type of obesity, gastroesophageal refluxed disease, leptin, leptinresistance.

Livzan M.A. – doctor of medical sciences, head of the chair for faculty therapy with the course of occupational diseases, prorector on scientific work

Lapteva I.V. – postgraduate student of the chair for faculty therapy

Krolevets T.S. – postgraduate student of the chair for faculty therapy, e-mail: mts-8-90@mail.ru

РОБОТИЧЕСКИЕ ОПЕРАЦИИ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ОПЫТ ПЕРВЫХ 50 ОПЕРАЦИЙ)

Сергей Валерьевич ЯРМОЩУК¹, Александр Сергеевич КУДРЯВЦЕВ¹,
Александр Александрович ЖЕРАВИН¹, Евгений Александрович ДРОБЯЗГИН^{1,2},
Алексей Николаевич АРХИПОВ¹

¹ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15, корп. 1

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

Цель исследования – оценка ближайших результатов роботических операций в урологической практике. С использованием системы da Vinci оперированы 50 пациентов со злокачественными образованиями предстательной железы I и II стадии. Длительность роботической простатэктомии и объем кровопотери во время операции были значительно меньше, чем при традиционном вмешательстве. Осложнений во время операции и в послеоперационном периоде не отмечено. У всех пациентов при выписке отсутствовали нарушения мочеиспускания. Таким образом, данная методика оперативного вмешательства является малотравматичным вмешательством, обеспечивая раннюю реабилитацию пациентов, что особенно важно для дальнейшего наблюдения и продолжения лечения.

Ключевые слова: роботассистированные вмешательства, урология, опухоли предстательной железы, рак предстательной железы.

Заболеваемость раком предстательной железы в России в 2012 г. составила 43,2 человека на 100 000 населения, а прирост абсолютно-го числа больных этой патологией с 2007 по 2012 г. – 43,8 %. В структуре онкологической заболеваемости среди мужского населения России рак предстательной железы занимает 2-е место (12,1 %). С каждым годом количество заболевших увеличивается примерно на 3 %. По смертности от всех видов рака среди мужчин в мире рак предстательной железы находится на втором месте. В США заболеваемость и смертность от данной патологии составляет более 120 и почти 20 человек на 100 000 мужчин соответственно [1, 5, 7, 15].

Основными методами лечения рака предстательной железы при I и II стадии являются радикальная простатэктомия и лучевая терапия предстательной железы, причем первый является предпочтительным при отсутствии противо-

показаний. На смену высокотравматичным «открытым» радикальным вмешательствам пришли малоинвазивные технологии. Лапароскопическая радикальная простатэктомия вывела на новый уровень использование видеозендоскопических технологий в практике урологических отделений [12, 13]. И если в начале 90-х годов XX столетия лапароскопическая техника выполнения простатэктомии была воспроизводима лишь в немногих крупных центрах хирургии с низким качеством абластичности выполнения операции, то ситуация кардинально изменилась в 1998 г., когда Guillonneau и Vallancien детализировали доступ при лапароскопической простатэктомии. Это обстоятельство положило начало всемирному интересу к малоинвазивной хирургии и широкому распространению этих операций в клиниках мира [9, 10, 12, 14]. Вторым мощным витком развития малоинвазивной хирургии послужила разработка и внедрение роботических операций при раке

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

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

Жеравин А.А. – к.м.н., зав. центром онкологии и радиохимики, e-mail: zheravin2010@yandex.ru

Дробязгин Е.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник центра онкологии и радиохимики, проф. кафедры госпитальной и детской хирургии лечебного факультета, 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

предстательной железы. В настоящее время данный вид вмешательства широко распространен в клиниках мира, о чем свидетельствует большое количество публикаций [3–6, 8, 11, 12, 14, 16].

В России роботическая хирургия пока не получила широкого использования, но преимущества этого вида операций очевидны: максимальное приближение операционного поля, трехмерное изображение, отсутствие дистанционного тремора. Это позволяет выполнить прецизионное выделение предстательной железы и окружающих структур, снизить число интраоперационных осложнений и повысить радикальность вмешательства. Самым большим опытом выполнения этих операций в России обладает клиника урологии Московского государственного медико-стоматологического университета [2]. В центре онкологии и радиохимирии Новосибирского НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина данный вид вмешательств выполняется в течение 1,5 лет. За это время получены результаты, указывающие на перспективность данного метода оперативного вмешательства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

За период с мая 2014 г. по декабрь 2015 г. в отделении Новосибирского НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина роботассистированные вмешательства при раке предстательной железы выполнены 50 пациентам в возрасте от 47 до 72 лет (в среднем 59,7 года). Распределение пациентов по возрасту представлено в табл. 1. Показанием к оперативному вмешательству был рак предстательной железы. Распределение пациентов по стадии заболевания и градации по Глиссону представлено в табл. 2 и 3. Как следует из табл. 2, основную массу оперированных составили пациенты со II стадией заболевания. Во всех случаях гистологическая верификация проведена на догоспитальном этапе,

у 38 (76 %) человек обнаружена мелкоацинарная аденокарцинома, у 12 (24 %) – аденокарцинома.

Все операции проводились в условиях общей анестезии с интубацией трахеи. На этапе освоения вмешательства помимо хирурга работали два ассистента. По мере накопления опыта работы в операции стали принимать участие два хирурга (ведущий и ассистент). Все вмешательства производились на системе da Vinci с возможностью трехмерной визуализации. Система da Vinci состоит из консоли, за которой сидит оперирующий хирург, и непосредственно робота-манипулятора, снабженного 3 слотами и портом для оптики. Хирург имеет полный контроль над системой da Vinci, который передается с его рук в меньшие и более точные движения крошечных инструментов внутри тела больного. Особенностью инструментов, вводимых в брюшную полость пациента, является то, что они способны вращаться и сгибаться больше, чем запястье человека, это позволяет врачу оперировать с улучшенным видением, точностью и контролем движений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех случаях пациентам выполнена роботическая простатэктомия. Методика вмешательства несколько отличалась от лапароскопического варианта простатэктомии. Первым этапом по средней линии живота ниже пупочного кольца проводился разрез кожи с последующей пункцией брюшной полости иглой «Вериша» и выполнением карбоксиперитонеума до 15 мм водного столба. После удаления иглы в брюшную полость вводились порт и оптика. Под визуальным контролем устанавливались еще 4 порта после рассечения кожи и подкожной клетчатки передней брюшной стенки. Пациент переводился в положение Тренделенбурга. В порты устанавливались роботические манипуляторы и выполнялся осмотр брюшной полости. Париетальный

Таблица 1

Распределение пациентов по возрасту

Возраст, лет	n	%
45–50	3	6
51–55	10	20
56–60	13	26
61–65	17	34
66–70	5	10
71–75	2	4
Всего	50	100

Таблица 2

Распределение пациентов по стадии заболевания

Стадия заболевания	n	%
T ₁ N ₀ M ₀	4	8
T _{1c} N ₀ M ₀	5	10
T ₂ N ₀ M ₀	10	20
T _{2a} N ₀ M ₀	11	22
T _{2b} N ₀ M ₀	9	18
T _{2c} N ₀ M ₀	11	22

Таблица 3

Распределение пациентов по классификации Глиссона

Градация по Глиссону, баллы	n	%
4 балла	1	2
5 баллов	10	20
6 баллов	19	38
6/7 баллов	5	10
7 баллов	12	24
7/8 баллов	1	2
8 баллов	2	4

листок брюшины рассекался по верхней полуокружности от левого семявыносящего протока по направлению к правому и отсепаровывался до предстательной железы. После мобилизации семявыносящих протоков проводилось их пересечение. Далее выделялась передняя поверхность предстательной железы до пубопростатических связок, осуществлялась мобилизация ее боковых поверхностей с сохранением сосудисто-нервных пучков. Затем предстательная железа отделялась от мочевого пузыря с отделением задней поверхности железы по направлению к семявыносящим протокам и семенным пузырькам с мобилизацией и пересечением протоков и семенных пузырьков и отсепаровкой прямой кишки. После этого пересекалась уретра, предстательная железа удалялась и помещалась в контейнер. Уретероцистоанастомоз формировался непрерывным швом с установкой в мочевой пузырь катетера Фоллея № 18 с наполнением мочевого пузыря 0,9%-м раствором хлорида натрия для определения герметичности анастомоза. Дополнительно осуществлялось дренирование брюшной полости через левый боковой порт к зоне анастомоза. Благодаря отличной визуализации органов, нервных и сосудистых структур, прецизионной техники выполнения вмешательства длительность операции не превышала 180 мин, а объем кровопотери в среднем значении не превышал 125 мл, что значительно меньше, чем при традиционном вмешательстве.

Осложнений при выполнении вмешательств не отмечалось. Дренаж из брюшной полости удалялся на 2–5 сутки после операционного периода (в среднем на 3 сутки). Уретральный катетер удалялся на 10 сутки после цистографии (у 48 пациентов). У двух пациентов выявлено подтекание контрастного вещества через уретероцистоанастомоз. Активной хирургической тактики не предпринималось. Уретральный катетер оставался еще на 2 суток с последующей уретероцистографией, при которой подтекания контрастного вещества не было. Катетеры удалены у всех пациентов. Во всех случаях на момент выписки из стационара мочеиспускание восстановлено, но наблюдалось подтекание нескольких капель мочи при смене положения тела.

Осложнений в послеоперационном периоде не было. С первых суток происходила активизация пациентов вследствие минимальной интраоперационной травмы. Болевой синдром в раннем послеоперационном периоде купирован введением нестероидных противовоспалительных препаратов. Нахождение пациентов в клинике в послеоперационном периоде не превышало 10–13 суток, что аналогично длительности пребывания

больных после «открытого» хирургического вмешательства. При этом ограничений по режиму в отличие от «открытого» вмешательства у пациентов не было, что указывает на лучшую реабилитацию уже в раннем послеоперационном периоде. Отмечены хорошие результаты по удержанию мочи и восстановлению мочеиспускания в отличие от традиционных вмешательств, что позволило пациентам быстрее социально адаптироваться.

Все пациенты выписаны из стационара в удовлетворительном состоянии для продолжения лечения. В сроки наблюдения до 3 месяцев с момента оперативного вмешательства состояние удовлетворительное. Мочеиспускание восстановлено у всех пациентов, задержек и нарушений не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные при лечении пациентов со злокачественными новообразованиями предстательной железы с использованием системы da Vinci, указывают на высокую эффективность и безопасность этих вмешательств, что важно в онкологической практике. Данная методика оперативного вмешательства малотравматична и обеспечивает раннюю реабилитацию пациентов, что особенно важно для дальнейшего наблюдения и продолжения лечения. Совместная работа с урологическими отделениями города, области и других регионов позволит улучшить качество оказания медицинской помощи этой категории пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и в странах СНГ в 2012 году. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014.
2. Пушкарь Д.Ю., Колонтарев К.Б. Роботассистированная радикальная простатэктомия. Руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 384 с.
3. Agarwal G., Valderrama O., Luchey A.M., Pow-Sang J.M. Robotic-Assisted Laparoscopic Radical Prostatectomy // Cancer Control. 2015. 22. (3). 283–290.
4. Autorino R., Zargar H., Mariano M.B. et al. Perioperative outcomes of robotic and laparoscopic simple prostatectomy: a European-American multi-institutional analysis // Eur. Urol. 2015. 68. (1). 86–94.
5. Cathelineau X., Rozet F., Vallancien G. Robotic radical prostatectomy: the European experience // Urol. Clin. North. Am. 2004. 31. 639–699.
6. Clavijo R., Carmona O., De Andrade R. et al. Robot-assisted intrafascial simple prostatectomy: novel technique // J. Endourol. 2013. 27. (3). 328–332.

7. Diaz M., Peabody J.O., Kapoor V. Oncologic outcomes at 10 years following robotic radical prostatectomy // *Eur. Urol.* 2015. 67. (6). 1168–1176.
8. Gandaglia G., Montorsi F., Karakiewicz P.I., Sun M. Robot-assisted radical prostatectomy in prostate cancer // *Future Oncol.* 2015. 11. (20). 2767–2773.
9. Guillonneau B., Cathelineau X., Barret E. et al. Laparoscopic radical prostatectomy: technical and early oncological assessment of 40 operations // *Eur. Urol.* 1999. 36. 14–20.
10. Feretti M., Phillips J. Prostatectomy for benign prostate disease: open, laparoscopic and robotic techniques // *Can. J. Urol.* 2015. 22. (Suppl. 1). 60–66.
11. Logigan H., Andras I., Pop C.D. et al. Robotic-assisted radical prostatectomy – the 5-year Romanian experience // *J. BUON.* 2015. 20. (4). 1068–1073.
12. Parsons J.K., Rangarajan S.S., Palazzi K., Chang D. A national, comparative analysis of perioperative outcomes of open and minimally invasive simple prostatectomy // *J. Endourol.* 2015. 29. (8). 919–924.
13. Rassweiler J., Stolzenburg J., Sulser T. et al. Laparoscopic radical prostatectomy: the experience of the German laparoscopic working group // *Eur. Urol.* 2006. 49. 113–119.
14. Rush S., Alibhai S.M., Xu L. Health-related quality of life in robotic versus open radical prostatectomy // *Can. Urol. Assoc. J.* 2015. 9. (5-6). 179–187.
15. Salomon L., Rozet F., Soulié M. Surgery of prostate cancer: Technical principles and perioperative complications // *Prog. Urol.* 2015. 25. (15). 966–998.
16. Sotelo R., Clavijo R., Carmona O. et al. Robotic simple prostatectomy // *J. Urol.* 2008. 179. (2). 513–515.

ROBOTIC OPERATIONS IN PROSTATE CANCER (THE EXPERIENCE OF 50 OPERATIONS)

Sergey Valer'evich YARMOSHCHUK¹, Alexandr Sergeevich KUDRYAVTSEV¹,
Alexander Alexandrovich ZHERAVIN¹, Evgeniy Alexandrovich DROBYAZGIN^{1,2},
Alexey Nikolaevich ARKHIPOV¹

¹ *Research Institute of Circulation Pathology n.a. Acad. EN Meshalkin of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechnunovskaya str., 15, bd. 1*

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

The aim of the study is the assessment of immediate results of operations in robotic urological practice. 50 patients with prostate malignant tumors of the stages I and II were operated with the use of da Vinci system. The robotic prostatectomy duration and extent of blood loss within the surgery were much less as compared with traditional surgery. The complications during surgery and in the postoperative period were not revealed. The urination disorders were absent in all patients at discharge. Thereby the surgery method is low traumatizing and provides early patients rehabilitation.

Key words: robotic-assisted operations, robotic interventions in urology, robotic interventions in prostate tumors, robotic interventions in prostate cancer.

Yarmoshchuk S.V. – oncosurgeon of department of radiotherapy, e-mail: kydas@mail.ru

Kudryavtsev A.S. – thoracic surgeon, oncologist of department of radiotherapy, e-mail: kydas@mail.ru

Zheravin A.A. – candidate of medical sciences, the head of department of center of oncology and radiosurgery, e-mail: zheravin2010@yandex.ru

Drobyazgin E.A. – doctor of medical sciences, associate professor of department of hospital and children's surgery, thoracic surgeon, leading researcher of center of oncology and radiosurgery, e-mail: evgenyidrob@inbox.ru

Arkhipov A.N. – candidate of medical sciences, staff cardiothoracic and vascular surgeon of pediatric cardiac surgery and newborn surgery center, e-mail: a.arkhipov@meshalkin.ru

КЛАПАНСОДЕРЖАЩИЙ КСЕНОВЕНОЗНЫЙ КОНДУИТ: TERRA INCOGNITA ИЛИ TABULA RASA?

**Ирина Юрьевна ЖУРАВЛЕВА¹, Елена Викторовна КАРПОВА²,
Елена Викторовна КУЗНЕЦОВА¹, Александр Сергеевич ЮНОШЕВ³,
Александр Андреевич КОРОБЕЙНИКОВ¹, Татьяна Павловна ТИМЧЕНКО¹,
Наталья Романовна НИЧАЙ¹, Илья Александрович СОЙНОВ¹,
Артем Викторович ГОРБАТЫХ¹**

¹ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина
Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

³ Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 15

Цель работы – комплексное исследование биоматериала яремной вены крупного рогатого скота (КРС) для создания на его основе оригинального кондуита, используемого у пациентов педиатрической группы. **Материал и методы.** Исследование носит экспериментальный характер. Эндоскопически отобранные образцы яремной вены КРС были обработаны 0,625%-м раствором глутарового альдегида (ГА), 5%-м раствором диглицидилового эфира этиленгликоля (ДЭ) или их сочетанием в различной последовательности. Гистохимически анализировали структуру консервированного биоматериала, определяли его упругопрочностные свойства, взаимодействие консервантов с биоматериалом изучали методом ИК-спектроскопии, выполняли оценку кальций-связывающего потенциала материала. **Результаты.** По результатам ИК-спектроскопии в стенке ксеновены, подвергшейся комбинированной обработке ГА + ДЭ, можно идентифицировать связи как ГА, так и ДЭ. На содержание сшивающего агента влияет последовательность обработки. При оценке физико-механических свойств все образцы, вне зависимости от способа консервации, были достоверно ($p < 0,05$) прочнее в 1,7–2,7 раза в циркулярном направлении, нежели в продольном. Наибольшая анизотропия упругопрочностных свойств выявлена в группах, где преобладало влияние ГА. Кальций-связывающий потенциал ксеновенозной стенки высок вне зависимости от вида сшивающего агента или их комбинации. Количественная оценка содержания кальция в образцах показала, что

Журавлева И.Ю. – д.м.н., проф., зав. лабораторией биопротезирования Центра новых технологий,
e-mail: i_zhuravleva@meshalkin.ru

Карпова Е.В. – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории физических методов исследования,
e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru

Кузнецова Е.В. – лаборант-исследователь лаборатории биопротезирования Центра новых технологий,
e-mail: ev_kuznetsova@meshalkin.ru

Юношев А.С. – к.ф.-м.н., зав. лабораторией высокоскоростных процессов, e-mail: yunoshev@hydro.nsc.ru

Коробейников А.А. – лаборант лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии Центра новых технологий, e-mail: a_korobejnikov@meshalkin.ru

Тимченко Т.П. – младший научный сотрудник лаборатории биопротезирования Центра новых технологий,
e-mail: t_timchenko@meshalkin.ru

Ничай Н.Р. – младший научный сотрудник Центра новых хирургических технологий,
врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения врожденных пороков сердца,
e-mail: n_nichay@meshalkin.ru

Сойнов И.А. – младший научный сотрудник Центра новых хирургических технологий,
врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения врожденных пороков сердца,
e-mail: i_sojnov@meshalkin.ru

Горбатых А.В. – к.м.н., младший научный сотрудник Центра новых хирургических технологий,
врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения врожденных пороков сердца,
e-mail: a.gorbatykh@meshalkin.ru

максимальная концентрация обнаружена при консервации ГА, а минимальная – при обработке ДЭ ($p = 0,00008$). Образцы, последовательно обработанные ДЭ и ГА, занимали по накоплению кальция промежуточное положение. Заключение. Учитывая значительное содержание коллагена в тканях кондуита, использование для базовой консервации эпоксидных соединений предпочтительно по сравнению с альдегидными, так как они позволяют улучшить упругопрочностные характеристики биоматериала и снизить его кальций-связывающий потенциал.

Ключевые слова: клапаносодержащий кондуит, бычья яремная вена, глутаровый альдегид, эпоксидные консерванты, кальций-связывающая активность.

В 1992 г. Yukio Ichikawa впервые предложил использовать клапаносодержащую яремную вену крупного рогатого скота (КРС) для реконструкции выводного отдела правого желудочка, клапана и ствола легочной артерии у детей раннего возраста. При этом в качестве основного консерванта автор аргументированно использовал полиэпоксидное соединение и продемонстрировал перспективность разработанного им кондуита в эксперименте на крупных животных [11, 12]. В конце 90-х годов разработкой коммерческого продукта – ксеновенозного кондуита, получившего название Contegra, занималась компания VenPro (США). При изготовлении Contegra была использована консервация глутаровым альдегидом (ГА). С 1999 г. дистрибьютором данного изделия в Европе стала компания Medtronic, которая в 2001 г. приобрела у VenPro все права на кондуит Contegra [6, 9]. Аналоги данного изделия отсутствуют как на мировом, так и на российском рынке. Ксеновенозный кондуит Contegra (Medtronic, США) довольно широко используется в хирургии сложных врожденных пороков сердца, накоплен опыт отдаленных результатов, известны практически все его достоинства и недостатки [2, 14, 20]. Однако до настоящего времени нет ясного понимания причин большинства отдаленных осложнений, что, по-видимому, связано с недостаточной изученностью самого материала кондуита. В связи с этим целью настоящей работы явилось комплексное исследование биоматериала яремной вены КРС с перспективой создания на его основе оригинального кондуита для пациентов педиатрической группы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное исследование, носящее экспериментальный характер, одобрено локальным этическим комитетом и проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

Консервация биоматериала. Клапаносодержащие сегменты яремной вены КРС получали в убойных цехах мясокомбинатов от животных, прошедших ветеринарный контроль. Сосуды

тщательно очищали от окружающих тканей, промывали в 0,9%-м растворе натрия хлорида и погружали в консервирующий раствор. Максимальный период от момента убоя животного до начала консервации составлял 6 ч. Использовали 6 схем консервации:

1 серия – 21 сутки в 0,625%-м растворе глутарового альдегида (ГА) на фосфатном буфере со сменой консервирующего раствора на 1, 3, 7 и 21 сутки;

2 серия – 3 суток в 0,625%-м растворе ГА на фосфатном буфере со сменой раствора через 1 сутки, на 3-и сутки биоматериал отмывали в 0,9%-м растворе натрия хлорида и перекладывали в 5%-й раствор диглицидилового эфира этиленгликоля (ДЭ) на фосфатном буфере, на 7-е сутки выполняли смену раствора и через 14 суток от начала консервации помещали биоматериал в раствор для хранения;

3 серия – через 1 сутки экспозиции в 0,625%-м растворе ГА заменяли консервант на 5%-й раствор ДЭ, на 3-и сутки его заменяли на свежий и через 14 суток считали консервацию завершённой;

4 серия – 14 суток консервировали биоматериал в 5%-м растворе ДЭ на фосфатном буфере со сменой раствора через 1 сутки;

5 серия – 3 суток консервировали материал в 5%-м растворе ДЭ со сменой через 1 сутки, с 3-х по 21-е сутки ксеновены находились в 0,625%-м растворе ГА (с заменой раствора на свежий на 7-е сутки);

6 серия – через 1 сутки консервации в 5%-м растворе ДЭ заменяли основной консервант на 0,625%-й ГА, в котором и обрабатывали биоматериал до 21-х суток с заменой ГА на свежеприготовленный на 3 и 7 сутки.

Для выполнения инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопия) образцы биоматериала отбирали на каждом этапе консервации, для остальных тестов – по окончании консервации.

Оценка структуры исходного биоматериала. Макроскопическое исследование проведено на 131 нативном сегменте яремной вены КРС. Часть сегментов разрезали продольно, оценивали количество и расположение створок в клапанах. Потенциально 3-створчатые клапаны просма-

тривали с использованием эндоскопа (Hopkins Telescope 45°, Karl Storz, Германия). При визуализации обращали внимание на количество створок, их анатомическое строение и структуру, осесимметричность и качество смыкания.

Для изучения микроструктуры из 5 образцов ксеновен, консервированных по схемам 1 и 4 (см. предыдущий пункт), вырезали кусочки стенки размером 1 × 1 см, а также створки, имеющие визуально однородную плотную структуру. Кусочки стенки были вырезаны также из 3 образцов кондуита Contegra (избытки материала, полученные при интраоперационном моделировании кондуита), образцы забирали в 4%-й формалин.

Морфологические исследования проводили после окрашивания гематоксилином и эозином, по Пикро–Маллори и по Ван Гизону.

Изучение взаимодействия консервантов с биоматериалом методом ИК-спектроскопии. Биоматериал высушивали при температуре 37 °С до постоянной массы, предварительно истерали, 1 мг полученного порошка смешивали с 10 мг бромида калия в вибрмельнице в течение трех минут. К смеси добавляли еще 140 мг бромида калия, измельчали 30 с и запрессовывали в пресс-форме диаметром 13 мм. ИК-спектры регистрировали в запрессовках на ИК-спектрометре Tensor 27 (Bruker Inc., Германия). Спектры нормализовали по полосе 1655 см⁻¹ (амид I), исходя из неизменного содержания амидных групп в белках до и после модифицирования. Спектры образцов, консервированных по различным схемам, сравнивали со спектром нативного (неконсервированного) материала.

Для выяснения природы взаимодействия белка с ГА или ДЭ изучали вторые производные спектров и разностные спектры.

Изучение упругопрочностных свойств стенки ксеновены. Испытания выполняли путем одноосного растяжения однотипно приготовленных образцов. Из ксеновенозных стенок каждой серии (в соответствии со способом консервации) вырубали по 10 образцов в виде «лопаток» в продольном и циркулярном направлениях с использованием специального ножа по ГОСТ Р МЭК 60811-1-4-2008. Эксперимент выполнен на разрывной машине Zwick/Roell (тип BDO-FB010TN; Zwick GmbH & Co. KG, Германия) при постоянной скорости нагружения образцов 50 мм/мин. Растяжение образцов останавливали при появлении первых признаков разрыва материала. Измеряли удлинение образца и соответствующее ему усилие на траверсе разрывной машины. На основании этих данных рассчитывали деформацию образца (E) по формуле $E = \Delta l / l_{\text{исх}}$, где Δl – удлинение образца до разрыва, $l_{\text{исх}}$ – начальная дли-

на; а также напряжение (S): $S = F/s$, где F – сила растяжения, s – площадь начального наименьшего сечения образца, перпендикулярного направлению растяжения. На основании этих расчетов строили диаграммы растяжения образцов («напряжение/деформация»).

По диаграмме растяжения определяли модуль упругости образца, предел прочности и относительное удлинение (деформацию) при разрыве. Модуль упругости рассчитывали методом наименьших квадратов на участке кривой растяжения до деформации 0,15.

Оценка кальций-связывающего потенциала ксеновены, консервированной различными способами. Из образцов стенки ксеновены, обработанных различными способами, вырезали кусочки размером 5 × 5 мм, отмывали от консервирующего раствора и имплантировали 20 молодым крысам-самцам Wistar с массой тела 90 ± 4 г в подкожные карманы, сформированные из отдельных разрезов в области спины (по 3 кармана справа и слева от позвоночника). Каждый реципиент получал по 1 имплантату каждой серии (итого по 6 имплантатов). Каждой серии строго соответствовала локализация кармана. Через 60 дней животным выполняли эвтаназию сверхдозой севофлурана. Образцы удаляли из подкожных карманов, очищали от окружающей капсулы, тщательно промывали 0,9%-м раствором натрия хлорида и высушивали до постоянной массы при температуре 50 °С. Массу каждого образца фиксировали, после этого выполняли гидролиз каждого образца в 2 мл 2н HCl. Концентрацию кальция определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии и выражали в мг/г сухой ткани.

По 3 образца каждой серии после очистки от окружающей капсулы забирали в 4 % формалин для дальнейшего гистологического исследования. Использовали окрашивание гематоксилином и эозином и по методу фон Косса.

Гистологические исследования. Образцы подвергали стандартной проводке (изопропанол и парафин) и заливке в парафиновые блоки на аппарате Microm EC 350 (Thermo Scientific, США). Из парафиновых блоков с помощью роторного микротомы Microm HM325 (Thermo Scientific) получали серийные срезы толщиной 4 мкм, которые депарафинизировали, гидратировали в нисходящих спиртах и окрашивали с использованием наборов и реактивов Bio-Optica (Италия) стандартно гематоксилином и эозином, по Пикро–Маллори, по Ван Гизону или по методу фон Косса. После окрашивания по любому из вышеприведенных методов срезы быстро дегидратировали в восходящих (50–70–95%-х) спиртах, высушивали, просветляли в двух порциях толуола (по 5 мин в

каждой) и заключали под покровное стекло с использованием маунта HI-MO (Bio-Optica).

Статистическая обработка материала. Для оценки количества кальция в биоматериале, обработанном различными методами, использовали значения медиан (Me) и межквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля) в каждой серии; достоверность различий между группами определяли с помощью теста Краскела–Уоллиса с последующим множественным попарным сравнением средних рангов для всех групп. Различия между группами считали достоверными при значении критерия $p \leq 0,05$.

При оценке упругопрочностных свойств биоматериала для каждой серии образцов вычисляли среднее значение определяемых параметров и стандартное отклонение. При построении усредненной диаграммы деформирования для однотипных образцов диаграмму каждого образца разбивали на сто равных отрезков по деформации. После этого из всех диаграмм брали значения деформации и напряжения в конце отрезков с одинаковым номером и вычисляли их средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На этапе первичной селекции ксеновенозных сегментов потенциально пригодными для создания кондуита оказались лишь 30 % (рис. 1, а). Остальные сегменты содержали 2- или 4-створчатый клапан; створки располагались на разном уровне либо различались по площади (рис. 1, б). При эндоскопической оценке почти 50 % 3-створчатых клапанов имели различные дефекты: недостаточную для полноценного смыкания площадь одной или нескольких створок (рис. 2, а), анатомические отверстия (рис. 2, б) либо дефекты свободного края (рис. 2, в). Таким образом, для создания кондуитов могло быть использовано не более 15 % исходного сырья, это были сегменты, имеющие достаточную длину под- и надклапанной частей, компетентный 3-створчатый клапан с однородной структурой и анатомически правильным расположением створок (рис. 2, г).

Микроструктура ксеновенозной стенки не зависела от способа консервации и территориального происхождения биоматериала: венозная стенка, полученная на местном мясокомбинате, обработанная ГА или ДЭ, так же, как и стенка Contegra, состоит из коллагеновых и эластиновых волокон (рис. 3). При этом эластиновые волокна четко очерчены и хорошо дифференцируются при различных окрасках; плотность их приблизительно одинакова во всех образцах; по отношению к оси сосуда они располагаются как продольно, так

и циркулярно. Коллагеновые волокна представлены в большом количестве: они окрашены в синий цвет по Пикро–Маллори (рис. 3, б), в фиолетовый гематоксилином и эозином (рис. 3, а) и в оранжево-красный по Ван Гизону (рис. 3, в).

При исследовании стенки ксеновены методом ИК-спектроскопии оказалось, что спектры нативных (неконсервированных) образцов, полученных от разных животных, практически однородны (рис. 4, а). Основные отличия спектров связаны с различиями содержания воды и жировой ткани в отдельных образцах. Различия, касающиеся жировой ткани, проявляются в виде следующего набора полос поглощения: 2923, 2852 см^{-1} (валентные колебания CH_2 -групп в цепочках), плечо 1740 см^{-1} (колебания сложноэфирной связи в триглицеридах), 1464 см^{-1} (деформационные (ножничные) колебания CH_2 -групп в цепочках), 1242 см^{-1} (валентные асимметричные колебания С–О-связи в сложноэфирной группе), 1176 см^{-1} (валентные симметричные колебания С–О-связи в сложноэфирной группе), 721 см^{-1} (маятниковые колебания CH_2 -групп в цепочке длиннее 3 углеродных атомов). Различное содержание влаги в образцах проявляется в области валентных колебаний гидроксильных групп 3100–3600 см^{-1} . Однако все эти различия не затрагивают групп, потенциально участвующих в реакциях с альдегидными и эпоксидными сшивающими агентами. Это позволяет с достаточной степенью точности оценить молекулярные трансформации биоматериала в процессе консервации.

При обработке ГА в течение 21 суток в спектрах значительно уменьшается интенсивность полосы поглощения первичных аминогрупп (1049 см^{-1}), что хорошо видно на вторых производных полученных спектров (рис. 4, б). Увеличивается интенсивность поглощения полос вторичных аминогрупп (1119 см^{-1}) и вторичных гидроксильных групп (1241, 1100 см^{-1}). Появляются полосы поглощения цепочки C_3H_6 на 731 см^{-1} . Эта полоса немного сдвинута относительно поглощения длинных цепочек в молекулах жиров (723 см^{-1}). Исчезновение поглощения первичных аминов и появление поглощения вторичных аминов и вторичных гидроксильных групп говорит о том, что взаимодействие идет по первичным аминогруппам белка. ГА вступает в реакцию в виде альдегида, а не ацетала. Образовавшийся продукт конденсации, по-видимому, остается в виде гем-аминоспирта, не превращаясь далее в имин.

При консервации ДЭ (рис. 4, в) нарастает содержание простых эфирных групп (полосы 1082, 1127, 1141 см^{-1}); помимо этого во всех спектрах присутствует слабая полоса 859 см^{-1} , характери-

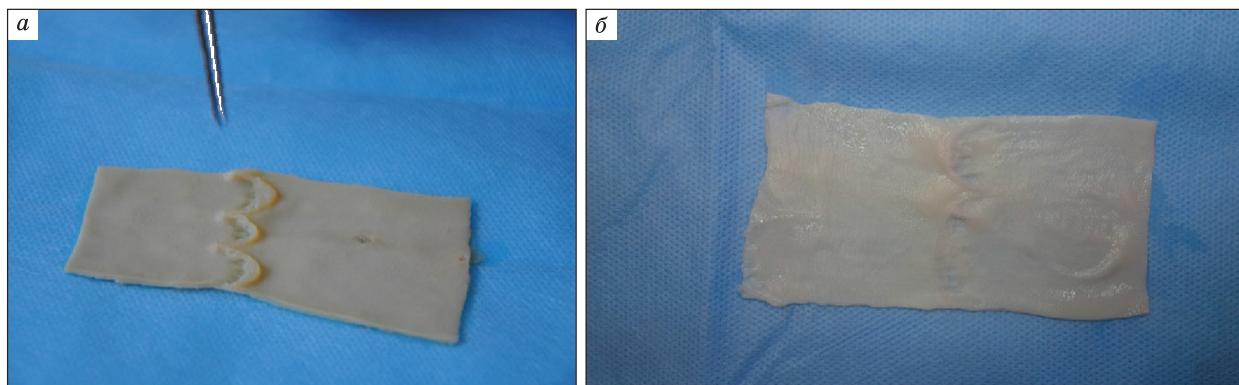


Рис. 1. Вариабельность структуры венозного клапана яремной вены КРС: а – продольно рассеченный фрагмент яремной вены с хорошо выраженным 3-створчатым клапаным аппаратом; б – продольно рассеченный фрагмент яремной вены с 2-створчатым клапаном

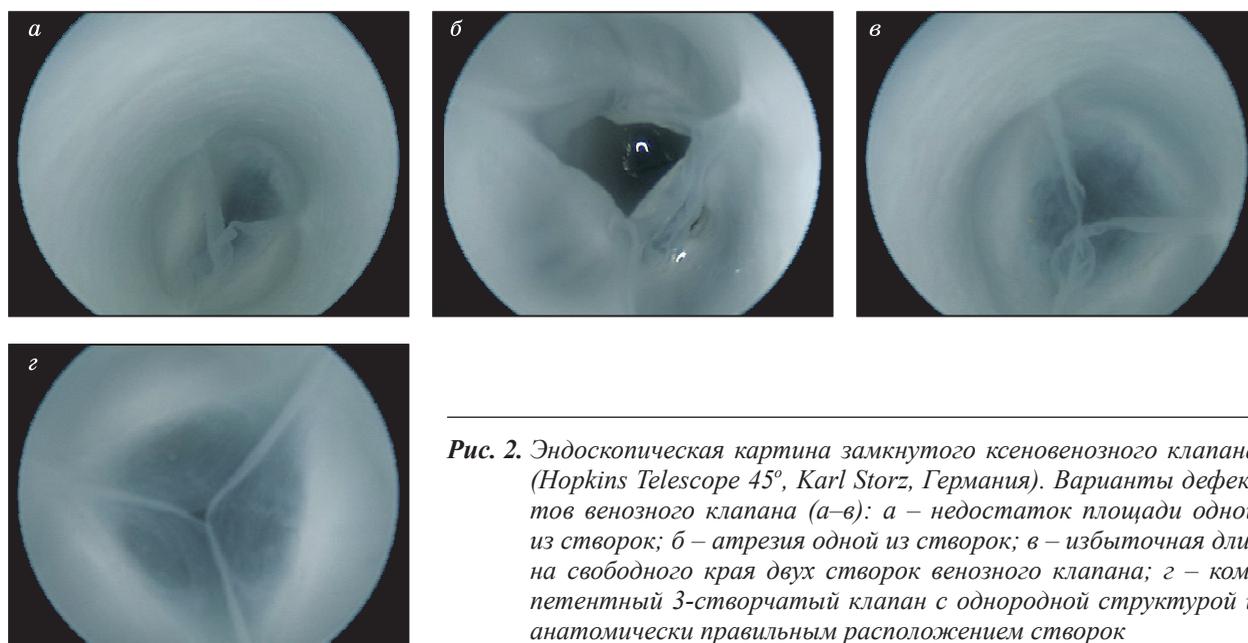


Рис. 2. Эндоскопическая картина замкнутого ксеновенозного клапана (Horkins Telescope 45°, Karl Storz, Германия). Варианты дефектов венозного клапана (а–в): а – недостаток площади одной из створок; б – атрезия одной из створок; в – избыточная длина свободного края двух створок венозного клапана; г – компетентный 3-створчатый клапан с однородной структурой и анатомически правильным расположением створок

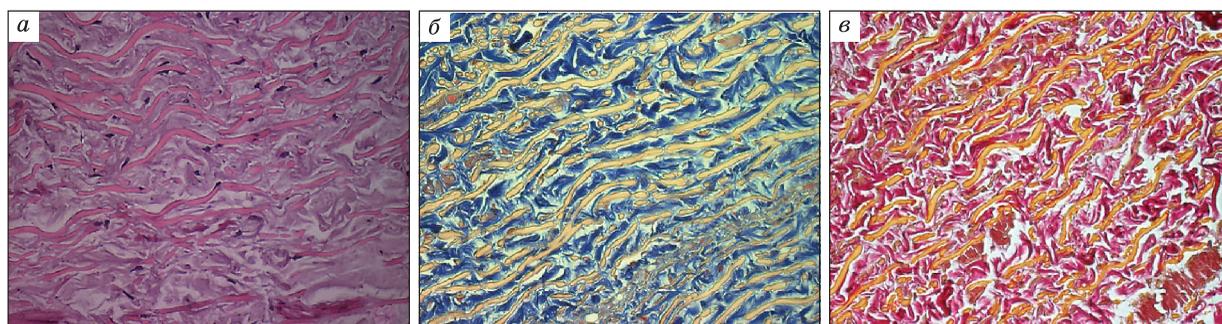


Рис. 3. Микроскопическое строение ксеновенозной стенки: а – консервация биоматериала ГА (окраска гематоксилином и эозином); б – консервация ДЭ (окраска по Пикро–Маллори); в – микроструктура стенки кондуита Contegra (окраска по Ван Гизону). Ув. × 400

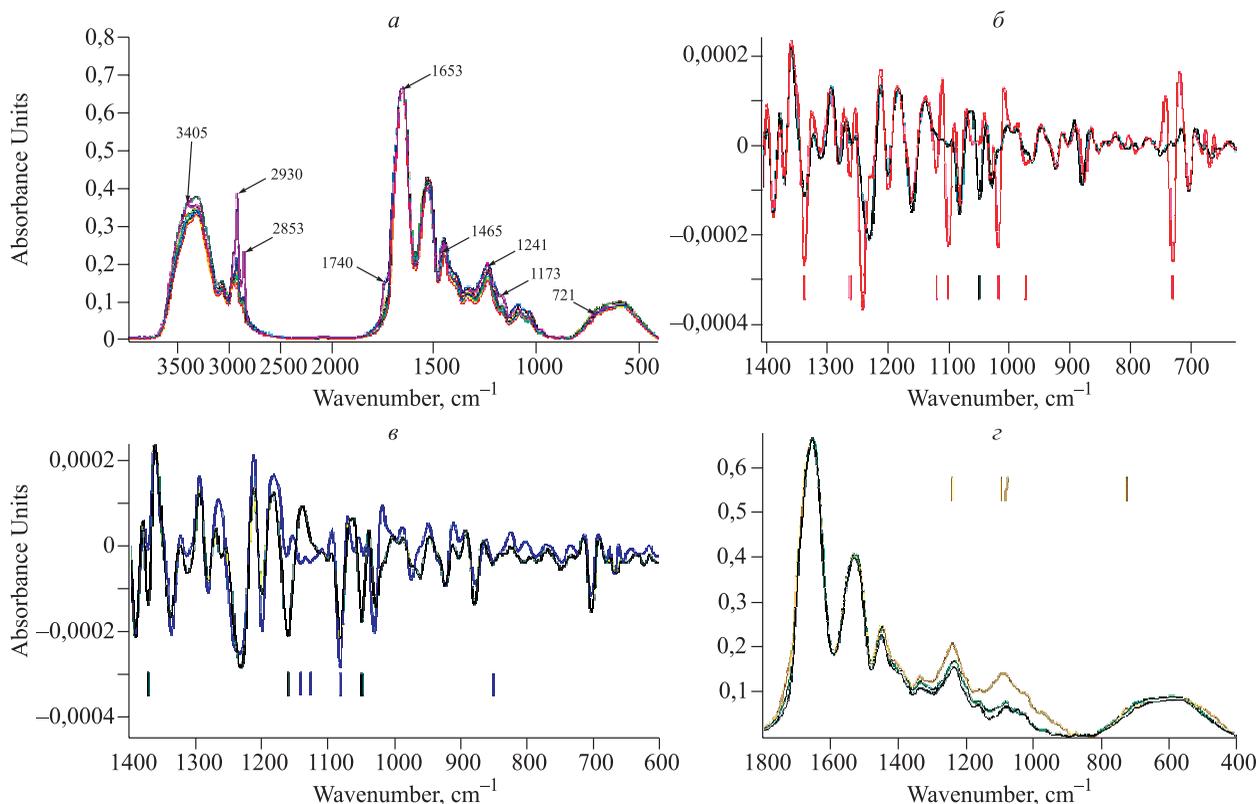


Рис. 4. Результаты ИК-спектроскопии нативных и консервированных образцов: а – ИК-спектры нативных (неконсервированных) образцов; б – вторые производные ИК-спектров нативного (черная линия) и консервированного глутаральдегидом (красная линия) образцов в диапазоне 1400–600 см⁻¹; в – вторые производные ИК-спектров нативного (черная линия) и консервированного ДЭ (синяя линия) образцов в диапазоне 1400–600 см⁻¹; г – ИК-спектры нативного (черная линия), консервированного последовательно ГА+ДЭ (оранжевая линия) и ДЭ+ГА (зеленая линия) образцов в диапазоне 1800–400 см⁻¹

зующая колебания нераскрывшегося эпоксидного цикла. Уменьшается интенсивность полосы поглощения первичных аминогрупп 1049 см⁻¹ и полос 1371 и 1160 см⁻¹, которые можно отнести к комбинации деформационных колебаний связей О–Н и С–О в фенолах (тирозин). Уменьшение интенсивностей поглощения первичных аминов и фенольных групп говорит о том, что ДЭ взаимодействует с первичными аминогруппами белка и фенольной группой тирозина через образование простой эфирной связи. Идентификация вторичных гидроксильных и аминогрупп, образующихся в данном процессе, затруднена из-за перекрытия их полос поглощения с поглощением простых эфирных связей (область 1095–1155 см⁻¹).

При комбинированной обработке ГА + ДЭ (серии 2 и 3) и ДЭ + ГА (серии 5 и 6) в спектрах можно идентифицировать связи с биоматериалом как ГА, так и ДЭ (рис. 4, г).

В ИК-спектрах образцов серии 2 и 3 видны полосы поглощения простых эфирных связей ДЭ (1083 см⁻¹), а также цепочки С₃Н₆ и вторичных спиртовых групп, вносимых в структуру при

консервации ГА. В образцах серии 5 и 6 интенсивности сигналов обоих реагентов ниже. Следует отметить, что на количественное содержание сшивающего агента влияет последовательность обработки: в сериях 2 и 3 преобладают фрагменты ДЭ, в сериях 5 и 6 – ГА.

При оценке физико-механических свойств необходимо отметить значительную вариабельность экспериментальных данных. Относительное стандартное отклонение любой измеряемой величины составляет не менее 10 %. Несмотря на это, очевидно, что все образцы, вне зависимости от способа консервации, достоверно ($p < 0,05$) прочнее в 1,7–2,7 раза в циркулярном направлении (рис. 5, б), нежели в продольном (рис. 5, а). Кроме того, модуль упругости продольных образцов выше, чем циркулярных, что свидетельствует об их большей жесткости (см. таблицу). Данный феномен обусловлен, по-видимому, преимущественно циркулярным расположением эластиновых волокон в стенке ксеновены.

Наибольшие различия упругопрочностных свойств между продольными и циркулярными образцами выявлены в группах, где преобладало

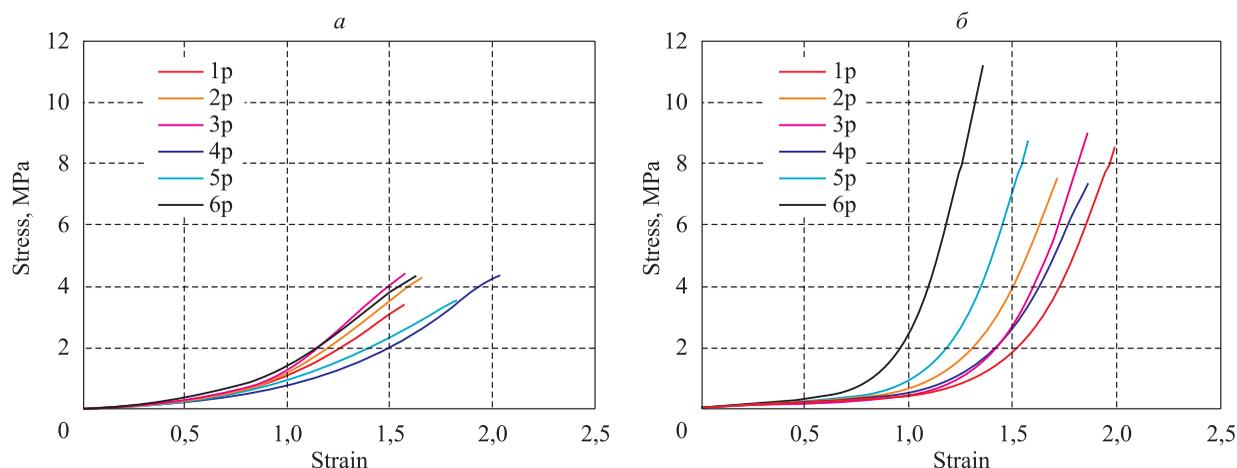


Рис. 5. Графики «напряжение/деформация» для образцов, вырезанных в продольном (а) и циркулярном (б) направлениях. Цифровые обозначения в легенде соответствуют номерам групп в зависимости от способа консервации

Таблица

Показатели разрушающего напряжения ($S_{разр}$) и модуля упругости (E) образцов ксеновены, вырезанных в продольном и циркулярном направлениях, в зависимости от способа консервации

Группа	$S_{разр}$ (МПа)		E (МПа)	
	продольное	циркулярное	продольное	циркулярное
1 – ГА	$3,5 \pm 1,2$	$9,4 \pm 1,0$	$0,62 \pm 0,20$	$0,31 \pm 0,05$
2 – ГА(3) + ДЭ	$4,5 \pm 2,0$	$8,9 \pm 2,5$	$0,72 \pm 0,15$	$0,39 \pm 0,12$
3 – ГА(1) + ДЭ	$4,3 \pm 1,4$	$6,9 \pm 2,5$	$0,55 \pm 0,14$	$0,40 \pm 0,11$
4 – ДЭ	$4,4 \pm 1,2$	$7,4 \pm 0,7$	$0,51 \pm 0,12$	$0,39 \pm 0,07$
5 – ДЭ(3) + ГА	$3,7 \pm 0,9$	$8,9 \pm 1,5$	$0,55 \pm 0,16$	$0,41 \pm 0,12$
6 – ДЭ(1) + ГА	$4,2 \pm 1,1$	$11,5 \pm 4,3$	$0,69 \pm 0,13$	$0,47 \pm 0,11$

Примечание. Величины показателей образцов ксеновены, вырезанных в продольном и циркулярном направлениях, при всех способах консервирования статистически значимо ($p < 0,05$) различаются.

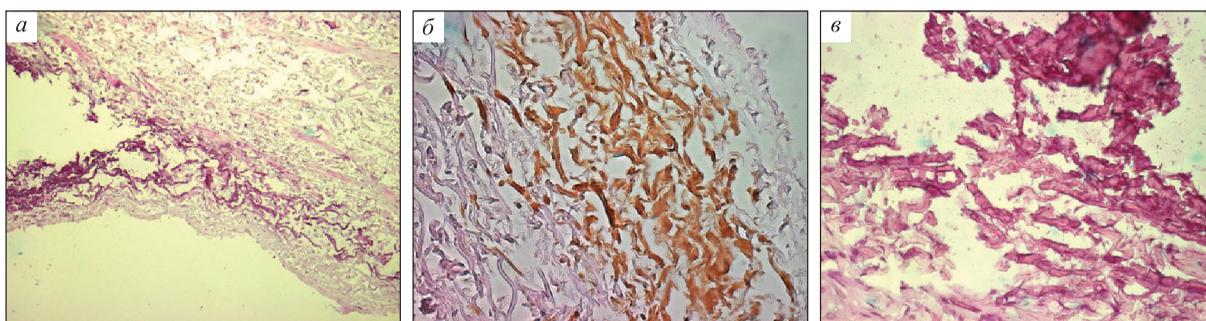


Рис. 6. Гистологическая оценка кальцификации ксеновены в модели подкожной имплантации крысам: а – субинтимальное расположение кальцинатов (гематоксилин и эозин, исх. ув. $\times 100$); б – депозиты кальция, связанные с эластиновыми волокнами (окраска по фон Коссу, исх. ув. $\times 400$); в – нарастание массы кристаллов и разрушение эластин-коллагеновых структур (гематоксилин и эозин, исх. ув. $\times 400$)

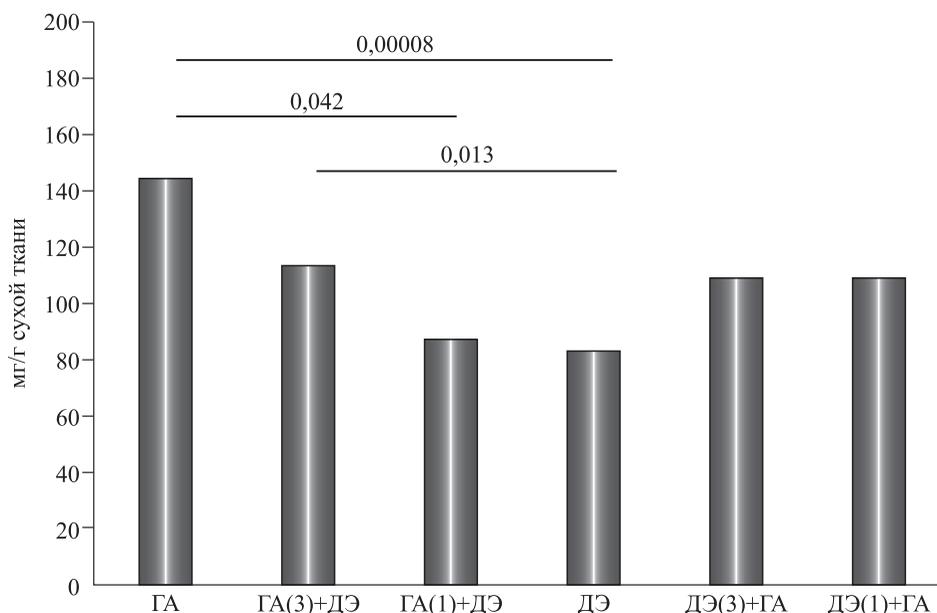


Рис. 7. Накопление кальция в стенке ксенокондуита в зависимости от метода ее консервации (мг/г сухого вещества). При последовательной обработке двумя консервантами: цифровые индексы – длительность (сутки) обработки первым консервантом. Горизонтальными линиями обозначения статистически значимые различия

влияние ГА. Так, для 1 серии (чистый ГА) прочность циркулярных образцов была в 2,7 раза больше, а жесткость – в 2 раза меньше, чем аналогичные показатели продольных образцов. Для серии 6 (1 сутки ДЭ + ГА) кратность различий составляла соответственно 2,7 и 1,7. В то же время циркулярные образцы, консервированные преимущественно диэпоксидом – серии 4 (чистый ДЭ) и 3 (1 сутки ГА+ДЭ) – демонстрировали меньшие различия жесткости – в 1,3 и 1,4 раза и прочности – в 1,6 и 1,7 раза соответственно.

Кальций-связывающий потенциал ксеновенозной стенки высок вне зависимости от вида сшивающего агента или их комбинации. Все удаленные через 2 месяца подкожные имплантаты были кальцинированы, причем основные конгломераты кальция располагались субинтимально (рис. 6, а). При окраске по фон Коссу на больших увеличениях хорошо видно, что кальциевые депозиты первоначально тесно связаны с эластиновыми волокнами, полностью повторяя их контуры (рис. 6, б). Затем, при нарастании массы кристаллов и разрушении эластин-коллагеновых структур, отложения кальция представляют собой не связанные с тканью конгломераты (рис. 6, в).

Тем не менее при количественном определении содержания кальция выявлены закономерные различия между группами, консервированными по различным схемам (рис. 7). Так, максимальную концентрацию кальция обнаружили в имплантатах, консервированных ГА; ми-

нимальную – в ДЭ-обработанных имплантатах ($p = 0,00008$). Меньшим ($p = 0,042$) содержанием кальция по сравнению с полной схемой шивки ГА (1-я группа) отличался биоматериал, консервированный ГА в течение 1 суток с последующей шивкой ДЭ (3-я группа); кальцификация его почти не отличалась ($p = 0,91$) от материала, обработанного только ДЭ (4-я группа). Ксеновена, выдержанная в ГА в течение трех суток с последующим переносом в ДЭ (2-я группа), накапливала кальций значительно интенсивнее, чем ДЭ-обработанная ($p = 0,013$), и не отличалась по содержанию Са от ГА-обработанной ($p = 0,16$). Образцы, последовательно обработанные ДЭ и ГА, занимали по накоплению кальция промежуточное положение между 1-й и 4-й группами и достоверно от них не отличались.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на широкое клиническое использование кондуита Contegra, характеристики биоматериала, из которого он изготовлен, – структура, свойства и трансформации под влиянием различных консервантов – крайне скудно представлены в литературе. Соответственно, причины и патогенез развития тех или иных дисфункций Contegra не ясны, а пути совершенствования кондуита из яремной вены КРС не понятны.

Известно, например, что в структуре дисфункций кондуитов лидирующее место зани-

мает стеноз дистального анастомоза (40–60 %). Кальцификация ксеновенозной стенки встречается значительно реже – в 17–25 % удаленных кондуитов, и, как правило, не является самостоятельной причиной повторной операции. В то же время кальцификация ксеновенозных створок отмечена лишь в единичных исследованиях и, по-видимому, является вторичной по отношению к таким осложнениям, как инфекция и тромбоз [5, 9, 16, 20].

Первое и основное, что нужно учитывать, – это макро- и микроструктура биопротеза. Согласно нашим данным, лишь 15 % ксеновенозных сегментов, взятых в качестве сырья, содержат полноценные 3-створчатые клапаны с хорошей структурой и коаптацией створок. Ранее некоторые авторы тестировали 2- и 4-створчатые клапаны [15], однако показали их гидравлическую несостоятельность, в особенности после воздействия сшивающего агента ГА [18]. Поэтому мы считаем, что при отборе клапаносодержащих ксеновенозных сегментов обязателен двойной эндоскопический контроль с гидравлической пробой: до начала консервации выбраковке подлежат клапаны с исходно некомпетентным створчатым аппаратом; эндоскопическая оценка после консервации направлена на элиминацию сегментов с деформациями клапанов, вызванными влиянием химической сшивки.

Различия микроструктуры стенки и створки ксеновены могут послужить ключом к пониманию различий их кальций-связывающей активности. Наименее подверженная кальцинозу створка ксеновены [3, 8] полностью состоит из коллагена. Кальцификация коллаген-содержащих биоматериалов – довольно хорошо изученный и «управляемый» процесс. В частности, доказано, что эпоксидные консерванты значительно снижают кальцификацию коллагеновых структур [7]. В отличие от створки, ксеновенозная стенка содержит большое количество эластиновых волокон, которые практически не взаимодействуют с альдегидными и эпоксидными консервантами, что было доказано на примере очищенного фибриллярного эластина и стенки аорты свиньи, основным структурным компонентом которой также является эластин [4, 13, 17]. Однако если процессы кальцификации ксеноаортальной стенки хорошо изучены, то ксеновенозному биоматериалу посвящена всего одна работа [19], доказавшая, что эпоксиобработанная ткань накапливает кальций в значительно меньшей степени, чем консервированная ГА.

Эти результаты согласуются с данными, представленными в нашей работе. Стенка ксеновены, консервированная ДЭ, в течение двух меся-

цев имплантации накапливала почти в половину меньше кальция, чем ГА-консервированная (см. рис. 7). В то же время известно, что интенсивность кальцификации ксеноаортальной стенки не зависит от химического класса консерванта [4, 17]. Этот феномен можно объяснить тем, что в стенке вены, по сравнению с аортой, содержится значительно больше коллагена и меньше внеклеточного матрикса, в состав которого входят кальций-связывающие белки, например, тенасцин-С и ММР-9 [13]. Таким образом, накопление кальция в ксеновене может снижаться за счет того, что, по крайней мере, коллаген «защищен» от кальцификации эпоксидной сшивкой, и нуклеация кальция ограничена только эластином. Дополнительным подтверждением этой гипотезы служат морфологические находки (см. рис. 6), доказывающие тесную связь кальциевых депозитов с волокнами эластина.

Обращает на себя внимание тот факт, что при последовательной обработке ксеновенозной стенки альдегидным и эпоксидным сшивающими агентами ее кальций-связывающий потенциал различен. Так, после экспозиции в ГА в течение 1 суток с последующей полной «доконсервацией» ДЭ биоматериал приобретает свойства ДЭ-обработанного. В то же время образцы, первоначально консервированные ДЭ (1 и 3 суток) с дальнейшей обработкой ГА, кальцинируются в большей степени, чем обработанные только ДЭ, и лишь незначительно отличаются от ГА-обработанных. Это хорошо согласуется с данными ИК-спектроскопии о том, что молекулярные трансформации в биоматериале вызывают оба сшивающих агента, но при этом заключительная обработка оказывает более значительный эффект. Однако если длительность начального этапа консервации ГА составляет 3 суток, то дальнейшее воздействие ДЭ практически не влияет на кальций-связывающий потенциал биоткани.

Упругопрочностные характеристики биоматериала также зависят от структурных трансформаций под воздействием консервантов. Так, образцы, вырезанные в продольном направлении из ксеновены, подвергнутой длительному воздействию ГА – образцы серий 1 (чистый ГА), 2 (3 суток ГА+ДЭ) и 6 (1 сутки ДЭ+ГА) – характеризуются повышенным по сравнению с остальными сериями модулем упругости и, соответственно, выраженной анизотропией упругопрочностных свойств в продольном и циркулярном направлениях. В отдаленном послеоперационном периоде это может приводить к ускорению усталостных дисфункций кондуита. В то же время модуль упругости для образцов, вырезанных в циркулярном направлении, практически не зависит от

способа консервации, что согласуется с данными, полученными ранее [19].

Известно, что поперечные шивки, формируемые в коллаген-содержащих тканях ГА, придают им гидрофобность, избыточную жесткость и высокий кальций-связывающий потенциал. Эпоксидные консерванты, напротив, обеспечивают гидрофильность, упругопрочностные характеристики, близкие к нативному материалу, и выраженное ингибирование кальцификации при имплантации в организм реципиента. Ранее это было доказано на примере таких биоматериалов, как створки свиного аортального клапана, стенка внутренней грудной артерии и перикард КРС [1]. Как показали результаты проведенного исследования, это справедливо и для ксеновенозной стенки, содержащей в своем составе значительное количество коллагена.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что при последовательном воздействии на ткань ксеновены ГА и ДЭ ее упругопрочностные характеристики и кальций-связывающий потенциал зависят от скорости образования и количества преобладающих поперечных шивок. Известно, что образование поперечных связей при консервации биоткани ГА заканчивается на 95 % через 3 суток [1], тогда как ДЭ за это время формирует лишь 50 % связей с аминокетонами [10]. Очевидно, поэтому образцы, консервированные чистым ГА (1-я серия) и ГА в течение 3 суток с последующим воздействием ДЭ (2-я серия), практически не различаются по упругопрочностным характеристикам и кальций-связывающей активности. Аналогичные свойства присущи и образцам серии 6 (1 сутки ДЭ + ГА). Результаты ИК-спектроскопии подтверждают, что после 1 суток консервации ДЭ в биоматериале ксеновены сохраняется значительное количество свободных аминокетонных групп для формирования альдегидных шивок при последующем воздействии ГА. Однако те образцы, в которых эпоксидные шивки преобладают (серии 3 и 4), очень близки между собой и отличаются от других серий меньшей анизотропией упругопрочностных свойств и сниженным уровнем накопления кальция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение нужно отметить, что широкое применение в хирургии врожденных пороков сердца единственного на мировом рынке ксеновенозного кондуита Contegra обусловлено его оптимальными анатомическими и гемодинамическими характеристиками. Неудовлетворительные отдаленные результаты чаще всего связаны с осложнениями, вызванными недостаточно изу-

ченными свойствами биоматериала кондуита. Имеющийся значительный потенциал для совершенствования кондуитов из яремной вены КРС не может быть реализован без фундаментальных исследований, посвященных трансформациям протезного материала в результате воздействия консервантов, а в последующем, после имплантации – факторов организма реципиента. По результатам настоящей работы можно сделать два достоверных вывода.

1. Для тщательного отбора ксеновенозных сегментов с компетентным клапаном необходим надежный неинвазивный метод, каковым является, в частности, двойной эндоскопический контроль с гидравлической пробой.

2. Учитывая значительное содержание коллагена в тканях кондуита, использование для базовой консервации эпоксидных соединений предпочтительно по сравнению с альдегидными, так как эпоксиды позволяют улучшить упругопрочностные характеристики биоматериала и снизить его кальций-связывающий потенциал.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-8107.2016.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барбараиш Л.С., Барбараиш Н.А., Журавлева И.Ю. Биопротезы клапанов сердца: проблемы и перспективы. Кемерово, 1995. 400 с.
2. Лукьянов А.А., Караськов А.М., Горбатовых Ю.Н. и др. Ближайшие и отдаленные результаты операции Росса у пациентов педиатрической группы // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014. (2). 5–9.
3. Attmann T., Quaden R., Freistedt A. et al. Percutaneous heart valve replacement: histology and calcification characteristics of biological valved stents in juvenile sheep // Cardiovasc. Pathol. 2007. 16. 165–170.
4. Bailey M.T., Pillarisetti S., Xiao H. et al. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves // J. Biomed. Mater. Res. A. 2003. 66. 93–102.
5. Breymann T., Blanz U., Wojtalik M.A. et al. European Contegra Multicentre Study: 7-Year Results after 165 Valved Bovine Jugular Vein Graft Implantations // Thorac. Cardiovasc. Surg. 2009. 57. (5). 257–269.
6. Carrel T. Bovine valved jugular vein (Contegra™) to reconstruct the right ventricular outflow tract // Expert Rev. Medical Devices. 2004. 1. (1). 11–19.

7. Connolly J.M., Bakay M.A., Alferiev I.S. et al. Triglycidylamine cross-linking combined with ethanol inhibits bioprosthetic heart valve calcification // *Ann. Thorac. Surg.* 2011. 92. (3). 858–865.
8. Herijgers P., Ozaki S., Verbeken E. et al. Valved jugular vein segments for right ventricular outflow tract reconstruction in young sheep // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002. 124. 798–805.
9. Holmes A.A., Co S., Human D.G. et al. The Contegra conduit: Late outcomes in right ventricular outflow tract reconstruction // *Ann. Pediatr. Cardiol.* 2012. 5. (1). 27–33.
10. Patent № 5 880 242 US. Nonpolymeric epoxy compounds for cross linking biological tissue and bioprosthetic grafts prepared thereby / Hu C.B., Myers K.E., Nguyen-Thien-Nhon D. et al.; published 1999.
11. Ichikawa Y. A new RV-PA conduit with a natural valve made of bovine jugular vein // *ASAIO J.* 1992. 38. M266-M270.
12. Ichikawa Y., Noishiki Y., Soma T. et al. A new antithrombogenic RV-PA valved conduit // *ASAIO J.* 1994. 40. (3). M714-M718.
13. Perrotta I., Russo E., Camastra C. et al. New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review // *Histopathology.* 2011. 59. 504–513.
14. Protopapas A.D., Athanasiou T. Contegra conduit for reconstruction of the right ventricular outflow tract: a review of published early and mid-time results // *J. Cardiothorac. Surg.* 2008. 3. ID 62.
15. Qui Y., Quijano R. C., Wang S. K. et al. Fluid dynamics of venous valve closure // *Ann. Biomed. Eng.* 1995. 23. 750–759.
16. Urso S., Rega F., Meuris B. et al. The Contegra conduit in the right ventricular outflow tract is an independent risk factor for graft replacement // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2011. 40. 603–609.
17. Vyavahare N., Ogle M., Schoen F.J. et al. Elastin calcification and its prevention with aluminum chloride pretreatment // *Am. J. Pathol.* 1999. 155. (3). 973–982.
18. Wu Z.S., Zhang J.C., Cheng D. Morphologic and hydrodynamic characteristics of bovine jugular venous conduit with valves // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003. 28. (3). 298–300. [In Chinese].
19. Xu Z.J., Wu Z.S., Hu T.H. et al. Bovine jugular venous conduit treated with the polyepoxy compound // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2006. 31. (3). 355–358. [In Chinese].
20. Yuan S.-M. The contegra valved bovine conduit: A biomaterial for the surgical treatment of congenital heart defects // *Arq. Bras. Cardiol.* 2012. 99. (6). 1159–1165.

VALVE-CONTAINING XENOVENOUS CONDUIT: TERRA INCOGNITA OR TABULA RASA?

**Irina Yur'evna ZHURAVLEVA¹, Elena Victorovna KARPOVA²,
Elena Victorovna KUZNETSOVA¹, Alexandr Sergeevich YUNOSHEV³,
Alexandr Andreevich KOROBAYNIKOV¹, Tat'yana Pavlovna TIMCHENKO¹,
Nataliya Romanovna NICHAY¹, Ilya Alexandrovich SOYNOV¹,
Artem Viktorovich GORBATYKH¹**

¹ *Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology n.a. academician Meshalkin E.N.
of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15*

² *Institute of Organic Chemistry of SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentev av., 9*

³ *Institute of Hydrodynamics of SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentev av., 15*

The goal of this study was to evaluate bovine jugular vein as a potential material for original vascular conduit used in pediatric patients. Materials and methods. Endoscopic obtained bovine vein specimens were treated with either 6.25 % glutaraldehyde (GA), or 5 % ethylene glycol diglycidyl ether (DE), or both in different order. Histochemical, mechanical and calcium-binding properties of conserved material were evaluated. Interaction of the material and conserving solutions was also evaluated by means of IR-spectroscopy. Results. According to IR-spectroscopy, both GA and DE chemical bounds were identified in the wall of xeno-vein treated with GA+DE combination. The amount of conserving agent in specimens was determined by sequence of treatment. Independently of conservation method, all specimen demonstrated 1.7–2.7 higher ($p < 0.05$) mechanical strength in radial direction versus longitudinal direction. The greatest anisotropy of elasticity and mechanical strength was demonstrated in specimens treated with GA. Calcium-binding properties are not influenced by treatment method. The highest amount of calcium was found in GA-treated specimens and the lowest in DE-treated specimens ($p = 0.00008$). Specimens treated with DE+GA combination demonstrated medium quantities of calcium. Conclusion. Considering significant amount of collagen in conduit tissue, utilization of epoxy compounds is preferred for basic conservation, versus aldehyde compounds. This is because the former improves mechanical properties of the material and decreases its calcium binding potential.

Key words: valve-containing conduit, bovine jugular vein, glutaraldehyde, epoxy based conservants, calcium binding properties.

Zhuravleva I.Yu. – doctor of medical sciences, professor, the head of the laboratory of bioprosthesis,
e-mail: i_zhuravleva@meshalkin.ru

Karpova E.V. – candidate of chemical science, senior researcher of the laboratory of physical methods,
e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru

Kuznetsova E.V. – junior researcher of the laboratory of bioprosthesis, e-mail: ev_kuznetsova@meshalkin.ru

Yunoshev A.S. – candidate of physics and mathematics science, the head of the laboratory of high-speed processes,
e-mail: yunoshev@hydro.nsc.ru

Korobeynikov A.A. – junior researcher of the laboratory of experimental surgery and morphology,
e-mail: a_korobeynikov@meshalkin.ru

Timchenko T.P. – junior researcher of the laboratory of bioprosthesis, e-mail: t_timchenko@meshalkin.ru

Nichay N.R. – junior researcher of the centre new technologies, cardiac surgery of department pediatric cardiac surgery, e-mail: n_nichay@meshalkin.ru

Soynov I.A. – junior researcher of the centre new technologies, cardiac surgery of department pediatric cardiac surgery, e-mail: i_soynov@meshalkin.ru

Gorbatykh A.V. – candidate of medical sciences, junior researcher of the centre new technologies, cardiac surgery of department pediatric cardiac surgery, e-mail: a.gorbatykh@meshalkin.ru

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ КОРРЕКЦИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА У НОВОРОЖДЕННЫХ И ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА ПРИ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЯХ

Николай Петрович ЛЕОНОВ, Александр Михайлович КАРАСЬКОВ,
Олег Всеволодович СТРУНИН

Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Цель работы – сравнительное исследование методов коррекции геморрагического синдрома у новорожденных и детей раннего возраста при кардиохирургических операциях в результате проспективного исследования. **Материал и методы.** Отобрано 120 больных, которые методом «конвертов» рандомизированы на две равные группы: с применением цель-ориентированной терапии и с применением стандартной гемостатической терапии. Проведено статистическое сравнение клинических и лабораторных данных. **Результаты и их обсуждение.** Доказано, что применение цель-ориентированной терапии снижает тяжесть полиорганной недостаточности в 2 раза, объем общей кровопотери – на 34,5 % (на 10 мл/кг), частоту развития коагулопатии – на 21,6 %, частоту (на 20–30 %) и объемы (на 50–60 %) использования гемостатических препаратов и гемокомпонентов, уменьшает длительность послеоперационного периода на 30 % и 30-дневную смертность на 15 % по сравнению со стандартным протоколом гемостатической терапии. Примененный протокол цель-ориентированной терапии может быть рекомендован к клиническому использованию у кардиохирургических больных данной возрастной группы при кровотечениях.

Ключевые слова: кровотечения, геморрагический синдром, новорожденные, дети раннего возраста, цель-ориентированная терапия, тромбоэластография.

Кровотечение занимает 3 место среди причин смертности кардиохирургических больных. В кардиохирургии используется 30 % национального запаса компонентов крови. Важными факторами, определяющими интенсивность послеоперационной кровопотери, являются хирургическая техника, длительность искусственного кровообращения (ИК), возраст пациента, степень гипотермии, наличие выраженной застойной сердечной недостаточности до операции [28, 30]. Известно, что постперфузионный период у детей до 1 года жизни с врожденными пороками сердца (ВПС) сопровождается выраженными нарушениями тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, которые определяют тяжесть развития геморрагических осложнений [4, 7]. Необоснованная трансфузия большого объема компонентов крови приводит к осложнениям (легочная и почечная недостаточность), а также к коагулопатии разведения. Это доказано у детей при использовании эритромаcсы [23], а также большого объема свежзамороженной плазмы (СЗП) и тромбомаcсы [16].

На сегодняшний день отсутствует единый подход к оценке состояния гемостаза у детей раннего возраста и особенно новорожденных с ВПС в периоперационном периоде. На данный момент существуют два алгоритма гемостатической терапии: «эмпирический», частично основанный на стандартном наборе гемостатических тестов (коагулограмма, агрегатограмма, содержание тромбоцитов, активированное время свертывания (АСТ)), и цель-ориентированная терапия, основой которой являются данные тромбоэластографии (ТЭГ). Многочисленные исследования использования ТЭГ для цель-ориентированной терапии во взрослой кардиохирургии показывают снижение стоимости лечения на 50 % за счет уменьшения применения гемокомпонентов, сокращения кровопотери, частоты реторакотомий [8, 21, 25]. Нами не найдены рандомизированные проспективные исследования по сравнению применения модифицированных трансфузионных алгоритмов, включающих данные тромбоэластографии у детей раннего возраста в кардиохирургии (до 1 года) с другими гемостатическими

Леонов Н.П. – аспирант, врач-анестезиолог-реаниматолог детского отделения реанимации и интенсивной терапии, e-mail: NikoLeonov@ya.ru

Караськов А.М. – д.м.н., проф., академик РАН, директор

Струнин О.В. – д.м.н., врач-анестезиолог-реаниматолог, зав. детским отделением реанимации и интенсивной терапии

протоколами лечения. Имеются статьи, посвященные выявлению референтных пределов ТЭГ у пациентов разных возрастных групп, в том числе новорожденных [10, 12]. Встречаются данные, посвященные поиску предикторов кровопотери с использованием данных ТЭГ, у детей для исследования системы гемостаза при искусственно кровообращении (ИК) [20]. Существуют англоязычные рекомендации о возможности применения модифицированного протокола гемостатической терапии у детей с ВПС [9, 26]. А также имеется описание применения цель-ориентированной терапии в других областях медицины: в травматологии [1], при пересадке печени [27], в нейрохирургии [15] и гематологии [2]. Целью нашей работы является сравнение эффективности стандартной гемостатической терапии и цель-ориентированной терапии у новорожденных и детей раннего возраста с ВПС в результате проспективного рандомизированного исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Настоящее проспективное исследование одобрено этическим комитетом Новосибирского НИИ патологии кровообращения (ННИИПК) и проведено в детском отделении анестезиологии и реаниматологии с декабря 2013 по декабрь 2015 г. Пациентами являлись новорожденные и дети раннего возраста с ВПС, которые проходили лечение в клинике института. Перед включением пациентов в исследование получено согласие родителей пациентов на участие в нем. Критериями включения были возраст до 1 года, масса от 2,5 до 8 кг, первичная оперативная коррекция, отсутствие шока и инотропной поддержки, отсутствие необходимости искусственной вентиляции легких (ИВЛ), отсутствие пневмонии и сепсиса, нормальные показатели биохимии крови – почечных (креатинин, мочевины) и печеночных проб (АлАТ, АсАТ), отсутствие анамнестических данных о гематологической патологии и факта применения гемостатических препаратов и антикоагулянтов в дооперационном периоде.

Был проведен расчет объема выборки. В среднем по данным Федеральной службы государственной статистики за период с 2000 по 2012 г. рождаемость составила 1 575 000 человек в год. Известно, что каждый 8 ребенок из 1000 рождается с ВПС, таким образом, количество детей с ВПС составило в среднем 12 600 человек в год. Учитывая опыт нашей клиники, примерно 50 % из них будут прооперированы в условиях искусственного кровообращения, т.е. примерно 6300 человек в год. При доверительной вероятности

90 % и доверительном интервале 5 % требуемый объем выборки составляет 265 человек.

Для установления доли новорожденных и детей раннего возраста (до 1 года) со значимым кровотечением, требующим интенсивной терапии после кардиохирургических операций с ИК, в 2011 г. проведено пилотное исследование 300 больных. Выявлено, что 48 % пациентов требуют дополнительной терапии гемостатиками и гемокомпонентами в первые сутки после операции из-за продолжающегося кровотечения и прогрессирования коагулопатии. В дальнейшем большой объем кровопотери и массивная гемостатическая терапия приводят к увеличению тяжести синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) и длительности ИВЛ [5]. Практической целью настоящего исследования является уменьшение количества таких пациентов до 20 %. Использована формула расчета выборки: $n = [A + B]^2 \times [(p_1 \times (1 - p_1) + (p_2 \times (1 - p_2)))] / [p_1 - p_2]^2$, где p_1 = первая частота, в данном случае 0,48; p_2 = вторая частота, в данном случае 0,2; A – коэффициент уровня значимости, в данном случае 5 % – 1,96; B – коэффициент мощности, в данном случае 90 % – 1,28. Расчеты показали, что в каждой группе должно быть 55 человек. Решено было включить в исследование 120 человек – по 60 в каждую группу. Для того чтобы группы были демографически сравнимы, каждую группу формировали из 30 новорожденных и 30 детей раннего возраста. В дальнейшем методом «конвертов» пациенты распределялись на две группы: основную (с цель-ориентированной гемостатической терапией) и контрольную (со стандартным протоколом лечения геморрагического синдрома). Родителям пациентов не предоставлялась информация о результатах проведенной рандомизации.

Анестезиологическое обеспечение операций выполнялось по единому принятому в клинике протоколу. Индукция осуществлялась фентанилом или кетамином, после чего проводилась назо-трахеальная интубация. В дальнейшем использовалась комбинированная анестезия фентанилом, севораном, миоплегия поддерживалась пипекурония бромидом. Аминокaproновая кислота (ЕАКК) вводилась на предперфузионном этапе в дозе 2 мл/кг, добавлялась в контур аппарата ИК 2 мл/кг, а также в дозе 2 мл/кг использовалась в постперфузионном периоде. В экстракорпоральном контуре использовались отмытые донорские эритроциты для поддержания необходимого уровня гематокрита и гемоглобина. Объемная скорость перфузии составляла 2,5–3 л/(мин × м²). Гепаринизация осуществлялась до канюляции магистральных сосудов (3 мг/кг), а также гепарин вводился в контур ИК из расчета 50 мг/л.

В постперфузионном периоде проводилась нейтрализация гепарина из расчета 1:1,5. Адекватность гепаринизации и нейтрализации гепарина во время и после операции оценивалась по показаниям величины АСТ в соответствии с протоколом клиники. Всем пациентам проводилась процедура модифицированной ультрафильтрации [6].

Для исследования системы гемостаза были взяты пробы крови (объемом 3 мл в цитратную пробирку) на следующих этапах: 1-й этап – до оперативного вмешательства, 2-й этап – сразу после основного этапа операции (через 20 мин после введения протамина), 3-й этап – через 24 ч после операции. Проведено изучение плазменного (активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), протромбиновый тест с расчетом международного нормализованного отношения (МНО), тромбиновое время (ТВ), содержание фибриногена, АСТ) и тромбоцитарного гемостаза (содержание тромбоцитов, агрегационная активность тромбоцитов при индукции АДФ и адреналином), систем естественных антикоагулянтов (активность антитромбина III) и протеина С) и фибринолиза (активность плазминогена, содержание D-димера и растворимых фибриномономерных комплексов (РФМК)). Эти стандартные лабораторные тесты выполнялись в специализированной лаборатории гемостаза ННИИПК с использованием стандартных методик.

На каждом этапе и у каждого больного одним исследователем выполнялась ТЭГ с каолином (использовались обычные кюветы и кюветы с гепариназой) на аппарате Haemoscope TEG 5000 (Haemonetics, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Использовались стандартные методика и реактивы (Medtel, Австралия). В сравнительное исследование включены следующие показатели ТЭГ: интервал R (отражает время до начала образования фибрина), интервал K и угол α (отражают процесс взаимодействия тромбоцитов и фибриногена, а также процесс формирования фибрина), максимальная амплитуда (отражает максимальную прочность сгустка – показатель тромбоцитарной функции и прочности фибрина), коагуляционный индекс CI (вычисляемый параметр, объединяющий предшествующие четыре измерения), процент фибринолиза в течение 30 минут Lu30. Дополнительно при необходимости контроля тесты ТЭГ были выполнены повторно.

Гемотрансфузионная терапия назначалась только по согреванию до 35 °С при наличии интенсивного кровотечения. Интенсивным кровотечением считали наличие кровопотери от 1,5 мл/кг за 3-минутный период либо субъектив-

ное отсутствие сгустков в хирургической ране. При отсутствии кровотечения гемостатическую терапию не проводили. Нужно отметить, что с июня 2013 по июнь 2014 г. в связи с проведением карантинизации гемокомпонентов службой крови в России использование криопреципитата было временно ограничено. В это время вместо криопреципитата мы использовали СЗП. Все данные лабораторных тестов интерпретировались одним исследователем, непосредственно не связанным с проведением гемотрансфузионной терапии. Результаты сообщались лечащему анестезиологу, дежурным реаниматологу и хирургу в виде рекомендаций.

Таким образом, после основного этапа операции пациенты из контрольной группы при кровотечении получали СЗП 20 мл/кг. При интенсивном кровотечении использовался концентрат протромбинового комплекса – протромлекс 50–75 ЕД/кг. Также при наличии продолжающегося кровотечения и данных лабораторных гемостатических тестов в постоперационном периоде в палате реанимации (ОРИТ) больные получали дополнительную дозу протамина 1–1,5 мг/кг (при АСТ более 15 % от нормы), СЗП (при удлинении МНО в 1,5 раза от нормы, содержании фибриногена менее 1 г/л, трансфузия продолжалась до практически полной остановки кровотечения, плановая доза 15–20 мл/кг), криопреципитат (при содержании фибриногена менее 1 г/л – 0,5 дозы/кг), тромбомассу (при содержании тромбоцитов менее 50×10^9 /л, 0,3–0,5 дозы/кг), дополнительные 2 мл/кг ЕАКК всегда при продолжающемся кровотечении эмпирически.

Пациентам из основной группы все гемостатики назначались только при наличии кровотечения и лабораторных показаний [1, 9, 11, 20, 24, 26, 27] согласно протоколу, представленному в табл. 1. Отмытые эритроциты назначались всем больным в постперфузионном периоде при снижении содержания гемоглобина менее 100 г/л, а также при острой необходимости увеличения газотранспортной емкости крови.

При проведении исследования учитывались: общая кровопотеря, наличие значимой кровопотери в первый час пребывания в ОРИТ (более 2,5 мл/кг/ч), объем и характер гемотрансфузионной и крововосполняющей терапии за 2 суток, длительность ИВЛ, срок пребывания в ОРИТ, частота реанимационных мероприятий за 7 суток после операции и 30-дневная смертность. Помимо этого оценивалось наличие коагулопатии на 2 сутки согласно диагностической шкале Japanese Association for Acute Medicine [14] и СПОН на 7 сутки согласно диагностической шкале PELOD [18].

Таблица 1

Протокол цель-ориентированной терапии в основной группе

Название препарата	Показания
Протамин 1–1,5 мг/кг внутривенно	Интервал R, полученный в кювете с гепариназой, в 2 раза и более меньше, чем интервал R в обычной кювете
СЗП в дозе 15–20 мл/кг внутривенно	Удлинение интервала R в кювете с гепариназой > 10,5 мин; либо при отсутствии криопреципитата при наличии угла $\alpha < 40^\circ$, уровне фибриногена < 1 г/л (трансфузию СЗП продолжали до нормализации показателя R на уровень дооперационного)
Криопреципитат 0,5 дозы/кг внутривенно	Уровень фибриногена < 1 г/л и угол $\alpha < 40^\circ$
Тромбоконцентрат 0,3–0,5 дозы/кг внутривенно	Уровень тромбоцитов менее $50 \times 10^9/л$ и максимальная амплитуда < 40 мм
Протромлекс 50–75 ЕД/кг внутривенно	R > 15 мин, угол $\alpha > 40^\circ$, содержание фибриногена > 1 г/л
ЕАКК в дозе 2 мл/кг внутривенно	Показатель Ly30 > 3 %

Согласно протоколу исследования составлена база данных в виде количественных и качественных признаков. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число и относительная величина в процентах. Применялся анализ таблиц сопряженности, где оценивали значение статистики Пирсона χ^2 с поправкой Йейтса (при $n_{\text{явлений}} = 5-9$ в одной из ячеек), достигнутый уровень значимости (p) и коэффициент ϕ – показатель силы связи. При $n_{\text{явлений}} < 5$ использован точный критерий Фишера. Проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для описания полученных данных использованы медиана (Me), 25 и 75 % процентиля (P_{25} , P_{75}). Данные, имеющие нормальное распределение, были проанализированы с использованием t -критерия Стьюдента. Парное межгрупповое сравнение количественных показателей, имеющее асимметричное распределение, производилось с помощью U -критерия Манна–Уитни. Анализ выживаемости выполнялся путем построения таблиц дожития с графическим изображением кривых выживаемости по методу Каплана–Майера, для сравнения которых применялся логранговый критерий и обобщенный критерий Уилкоксона (критерий Гехана). Статистические гипотезы считались подтвержденными при уровне значимости $p < 0,05$.

Включено в исследование 138 пациентов – 72 новорожденных и 66 детей раннего возраста. В процессе отбора были исключены 18 детей (12 новорожденных и 6 детей раннего возраста): у 11 был выявлен инфекционный синдром, у двоих – геморрагическая болезнь новорожденных, у четверых – выраженная тромбоцитопения при поступлении в клинику института, у одного пациента – тромбофилия (мутация гена протром-

бина G20210A). Нозологическая характеристика исследуемых следующая: транспозиция магистральных сосудов ($n = 38$); атрезия/критический стеноз легочной артерии ($n = 10$); синдром гипоплазии левых отделов сердца ($n = 7$); коарктация (атрезия/гипоплазия дуги) аорты с дефектом межжелудочковой перегородки ($n = 5$); стеноз митрального клапана ($n = 1$); частичный аномальный дренаж легочных вен в верхнюю полую вену, ассоциированный с дефектом межпредсердной перегородки ($n = 4$); полная форма атриовентрикулярного канала ($n = 18$); общий аортальный ствол ($n = 1$); тетрада Фалло ($n = 6$); дефект межжелудочковой перегородки, ассоциированный с дефектом межпредсердной перегородки, открытым артериальным протоком ($n = 30$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сбора и обработки демографических и клинических данных групп исследования представлены в табл. 2. Только показатели времени окклюзии аорты в группах ($W = 0,96$, $p = 0,17$ для основной группы; $W = 0,96$, $p = 0,26$ для контрольной группы) имели нормальное распределение. Остальные показатели в группах имели ненормальное распределение ($p < 0,05$).

Сравнение демографических и клинических данных показало, что основная и контрольные группы сопоставимы по полу, расе, массе тела, возрасту на момент исследования, времени ИК, времени окклюзии аорты, доле циркуляторных арестов, а также температурному режиму. Также группы сопоставимы по доле пациентов со значимым послеоперационным кровотечением в первый час в ОРИТ (кровопотеря более 2,5 мл/кг/ч). Исследуемые группы значительно различаются: по уровню общей кровопотери – в основной группе ее объем был меньше на 34,5 %

Таблица 2

Демографические и клинические данные пациентов

Показатель	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60	Статистический анализ
Пол: мужской/женский, n (%) / n (%)	32 (53,3) / 28 (46,7)	33 (55) / 27 (45)	$\chi^2 = 0,03, p > 0,05; \varphi = 0,02$
Раса: монголоиды/европеоиды, n (%) / n (%)	42 (70) / 18 (30)	40 (66,7) / 20 (33,3)	$\chi^2 = 0,15, p > 0,05; \varphi = 0,04$
Масса тела на момент обследования, кг	4,9 (3,6; 6,2)	4,3 (3,3; 6,0)	$U = 608,5, p = 0,41$
Возраст на момент исследования, мес.	4,0 (0,3; 7,0)	3,0 (0,3; 5,0)	$U = 601,5, p = 0,37$
Время ИК, мин	103 (65; 141)	108 (81; 137)	$U = 612, p = 0,43$
Время окклюзии аорты, мин	63 (30; 80)	60 (45; 71)	$t = -0,32, p = 0,75$
Число пациентов с циркуляторным арестом, n (%)	5 (8,3)	7 (11,7)	$\chi^2_{(vc)} = 0,09, p > 0,05; \varphi = 0,06$
Температурный режим ИК, °С	32 (27; 33)	31 (25; 33)	$U = 640,5, p = 0,63$
Общая кровопотеря, мл/кг	19 (14; 28)	29 (21; 46)	$U = 356,5, p = 0,00$
Число больных со значимой кровопотерей в первый час в ОРИТ, n (%)	22 (36,7)	25 (41,7)	$\chi^2 = 0,32, p > 0,05; \varphi = 0,05$
Число больных с коагулопатией (по JAAM 2 сут.), n (%)	10 (16,7)	23 (38,3)	$\chi^2 = 7,1, p < 0,01; \varphi = 0,24$
Оценка СПОН по PELOD (7 сутки)	11 (10; 21)	21 (12; 22)	$U = 371, p = 0,00$
Число пациентов с реанимационными мероприятиями, n (%) *	7 (11,7)	22 (36,7)	$\chi^2_{(vc)} = 8,91, p < 0,01; \varphi = 0,3$
ИВЛ, ч	55 (24; 98)	82(42; 128)	$U = 477,5, p = 0,03$
Срок пребывания в ОРИТ, дней	7 (3; 8)	10 (8; 12)	$U = 380,5, p = 0,00$
30-дневная смертность, n (%)	3 (5)	12 (20)	$F = 0,01, p < 0,05; \varphi = 0,23$

* Реанимационные мероприятия были определены как неотложная эндотрахеальная реинтубация, возникающие прикратные хирургические процедуры или срочное хирургические вмешательства (реторакотомия, установка ЭКМО, СЛР, установка торакостомических трубок, начало ЗПТ).

(на 10 мл/кг меньше), по тяжести СПОН на 7 сут-ки после операции – в основной группе она была в 2 раза меньше, а также по частоте коагулопатии в раннем послеоперационном периоде, в основной группе она регистрировалась реже на 21,6 %. Важной, по-нашему мнению, находкой явилось значимое различие групп по частоте реанимационных мероприятий после операции (на 25 % меньше в основной группе), длительности ИВЛ (на 33 % меньше в основной группе), срокам пребывания в ОРИТ (на 30 % меньше в основной группе) и 30-дневной смертности (на 15 % меньше в основной группе).

Данные стандартных лабораторных тестов и ТЭГ, проведенных в основной и контрольной группах на этапах исследования, представлены в табл. 3 и 4. Только показатели количества тромбоцитов на третьем этапе исследования имели нормальное распределение – $W = 0,95, p = 0,1$ для контрольной группы и $W = 0,97, p = 0,36$ для основной группы. Все остальные данные в группах на этапах исследования имели ненормальное распределение ($p < 0,05$). На первом (до операции) и

втором (сразу после основного этапа операции) этапах значимых различий в показателях стандартных тестов гемостаза не выявлено. На третьем этапе обнаружены значимые различия между основной и контрольной группами в тестах внутреннего (АПТВ 0150 $U = 450,5, p = 0,00$) и внешнего (МНО – $U = 270,5, p = 0,00$) путей активации свертывания, уровне фибриногена ($U = 462, p = 0,00$), гемоглобина ($U = 502,5, p = 0,01$), количестве тромбоцитов ($t = -2,3, p = 0,02$), а также в величине АСТ ($U = 1236, p = 0,00$).

Все показатели ТЭГ имели ненормальное распределение на всех этапах исследования ($p < 0,05$). На первом и втором этапах значимых различий между группами в показателях ТЭГ не было. На третьем этапе выявлены значимые различия между основной и контрольной группами по следующим показателям ТЭГ: интервал R ($U = 658,5, p = 0,00$), интервал K ($U = 1183,5, p = 0,00$), угол α ($U = 1205, p = 0,00$), максимальная амплитуда ($U = 926, p = 0,00$), коагуляционный индекс CI ($U = 1093,5, p = 0,00$), а также «индекс гепаринизации» R/rh ($U = 1308,5, p = 0,01$).

Таблица 3

Показатели стандартных лабораторных тестов

Показатель	I этап		II этап		III этап	
	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60
АПТВ, с	46 (39; 55)	45 (41; 55)	50 (44; 66)	56 (45; 67)	41 (38; 47) *	46 (42; 53,5)
МНО	1,0 (0,9; 1,2)	1,0 (0,9; 1,2)	1,4 (1,2; 1,5)	1,5 (1,2; 1,6)	1,1 (1; 1,2) *	1,3 (1,2; 1,4)
ТВ, с	18 (17; 21)	18 (17; 21)	21 (19; 23)	21 (18; 23)	17,1 (16; 19,2)	18,2 (16,5; 21,3)
Содержание фибриногена, г/л	2 (1,4; 2,2)	2 (1,6; 2,4)	1,2 (0,8; 1,6)	1 (0,7; 1,8)	2,9 (2,2; 3,3) *	2,1 (0,8; 2,8)
Активность плазминогена, %	61 (53; 72)	60 (54; 73)	55 (47; 69)	50 (42; 60)	51 (45; 65)	53 (42; 70)
Содержание D-димера, мкг/мл	0,4 (0,3; 0,9)	0,4 (0,3; 0,8)	0,5 (0,3; 0,9)	0,5 (0,3; 1,1)	0,5 (0,3; 0,94)	0,6 (0,4; 1,2)
Содержание РФМК, мг/100 мл	6,5 (4,5; 10)	7,0 (4; 11)	5,5 (4; 7,5)	6 (4,5; 9)	9 (6,5; 13)	10 (6; 16)
Активность протеина С, %	48 (36; 62)	51 (40; 64)	55 (45; 72)	52 (43; 62)	58 (51; 70,3)	55 (45; 66)
Активность антитромбина III, %	69 (63; 84)	68 (57; 83)	63 (54; 80)	65 (50; 73)	70 (59; 85)	66 (46,4; 86)
Содержание тромбоцитов, × 10 ⁹ /л	329 (278; 387)	343 (250; 408)	148 (95; 170)	141 (78; 165)	147 (119; 178) *	133 (73; 158)
ААТ при индукции АДФ, %	60 (43; 65)	55 (41; 72)	25 (6; 42)	20 (6; 38)	50 (37; 62)	46 (35; 56)
ААТ при индукции адреналином, %	53 (18; 66)	45 (12; 72)	9 (2; 15)	5 (2; 10)	18 (10; 35)	20 (10; 43)
Содержание гемоглобина, г/л	126 (114; 140)	132 (117; 142)	149 (139; 158)	141 (128; 154)	148 (133; 154) *	135 (126; 143)
АСТ, с	93 (87; 102)	94 (86; 105)	125 (111; 135)	125 (110; 138)	104 (96; 111) *	111 (103; 120)

Примечание. ААТ – агрегационная активность тромбоцитов; здесь и в табл. 4 * – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 4

Показатели тромбозластографии

Показатель	I этап		II этап		III этап	
	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60
R	6,5 (4,5; 8,0)	6,8 (5,3; 8,0)	11 (9; 15,6)	11,5 (9; 14,8)	7,5 (6; 8,8) *	10 (8,8; 11,2)
K	1,6 (1,2; 2,2)	1,8 (1,2; 2,2)	4,2 (3,5; 7,2)	4,4 (3,7; 6,9)	2,9 (2,4; 3,6) *	3,3 (3; 4)
Угол α	65 (57; 72)	64 (60; 72)	44 (38; 49)	41 (34,2; 50)	55 (46; 58,4) *	49,5 (38,8; 53)
Максимальная амплитуда	62 (60; 67)	62,6 (60; 66)	43 (38; 47)	43 (34,7; 47,4)	53,5 (49,7; 57,6) *	47,7 (44,6; 49,3)
CI	-0,4 (-2,0; 1,7)	-0,5 (-2; 1,2)	-7,3 (-12,7; -5,2)	-7,6 (-12; -5,8)	-3,1 (-5,1; -1,8) *	-5,2 (-7,5; -3,5)
Ly30	0,7 (0,1; 1,6)	0,6 (0,2; 1,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0,3)	0,4 (0; 0,8)	0,5 (0; 1,3)
R/rh	–	–	1,1 (1; 1,1)	1,1 (1; 1,2)	1,1 (1; 1,2) *	1,2 (1; 1,4)

Примечание. R/rh – соотношение времени R в обычной кювете к времени R в кювете с гепариназой (rh), названное нами «индексом гепаринизации».

Таблица 5

Гемотранфузионная терапия

Показатель	Основная группа, n = 60	Контрольная группа, n = 60	Статистический анализ
Объем эритромаcсы в АИК, мл/кг	41,0 (31,3; 57,1)	42,5 (33,3; 55,0)	$U = 652, p = 0,73$
Объем эритромаcсы после операции / число пациентов, мл/кг / n (%)	0,0 (0,0; 5,3) / 16 (26,7)	10,0 (5,6; 25,0) / 28 (46,7)	$U = 381, p = 0,00;$ $\chi^2 = 5,17, p < 0,05; \varphi = 0,21$
Объем СЗП в АИК / число пациентов, мл/кг / n (%)	12,5 (5,6; 19,1) / 46 (76,7)	13,3 (6,1; 27,9) / 45 (75,0)	$U = 597,5, p = 0,35;$ $\chi^2 = 0,05, p > 0,05; \varphi = 0,02$
Объем СЗП после операции / число пациентов, мл/кг / n (%)	11,8 (4,8; 15,6) / 45 (75,0)	21,1 (14,0; 35,0) / 56 (93,3)	$U = 328, p = 0,00;$ $F = 0,01, p < 0,05; \varphi = 0,25$
Объем тромбомасcы после операции / число пациентов, мл/кг / n (%)	0,0 (0,0; 0,0) / 8 (13,3)	0,0 (0,0; 7,8) / 26 (43,3)	$U = 496, p = 0,04;$ $\chi^2_{(vc)} = 11,7, p < 0,01; \varphi = 0,33$
Объем криопреципитата после операции / число пациентов, мл/кг / n (%)	0,0 (0,0; 0,0) (0; 0) / 13 (21,7)	0,0 (0,0; 23,5) / 26 (43,3)	$U = 496,5, p = 0,04;$ $\chi^2 = 6,4, p < 0,05; \varphi = 0,23$
Число пациентов, у которых применялись концентраты факторов свертывания (протромплекс, новосевен), %	17 (28,3)	29 (48,3)	$\chi^2 = 5,1, p < 0,05; \varphi = 0,21$
Объем ЕАКК, мл/кг	5,2 (4,7; 5,9)	7,4 (6,0; 8,6)	$U = 279, p = 0,00$
Соотношение доз гепарина и протамина	0,6 (0,5; 0,7)	0,4 (0,4; 0,7)	$U = 488,5, p = 0,03$

Примечание. АИК – аппарат искусственного кровообращения.

Особенности гемотранфузионной терапии в исследуемых группах представлены в табл. 5. Данные имели ненормальное распределение, поэтому применены методы непараметрической статистики для анализа различий между группами.

Группы не имели значимых различий в объемах и частоте использования отмытых эритроцитов и СЗП для первичного заполнения контура ИК во время кардиохирургических операций. Установлено, что после основного этапа операции частота использования в основной группе

отмытых эритроцитов и концентратов факторов свертывания была меньше на 20 %, СЗП – на 18,3 %, криопреципитата – на 21,6 %, тромбомасcы – на 30 %. Установлено, что в основной группе введение антифибринолитиков (ЕАКК) было меньше на 29,7 %, а протамина – на 33,3 % по сравнению с контрольной группой. Сравнение израсходованного объема гемокомпонентов после основного этапа операции в основной и контрольной группах показало, что в основной группе израсходовано меньше эритромаcсы (на 57 %), СЗП (на 53,3 %), тромбомасcы (на 60,7 %) и криопреципитата (на 54,1 %).

Кривые выживаемости пациентов основной и контрольной групп, а также результаты их сравнения представлены на рисунке. Судьба пациентов отслеживалась до выписки из стационара. Доказано, что применение цель-ориентированной терапии увеличивает выживаемость пациентов на 15 % ($p = 0,18$ для логрангового критерия, $p = 0,13$ для обобщенного критерия Уилкоксона) по сравнению со стандартным протоколом гемостатической терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Не было различий между группами по показателям ТЭГ и стандартных тестов гемостаза на дооперационном этапе и сразу после операции. Показатели тестов гемостаза до операции укладываются в общепринятые нормы для новорож-



Рис. Кривые выживаемости пациентов основной и контрольной групп

денных и детей до 1 года [3, 10, 12]. Выявленные по результатам стандартных тестов у части больных гиподисфункция тромбоцитов, небольшой дефицит контактных факторов активации, дефицит естественных антикоагулянтов, а также дефицит фибринолитического потенциала крови может быть обусловлен функциональной незрелостью, наличием порока сердца. Показатели гемостаза после операции соответствовали состоянию больных, перенесших обширную хирургическую травму, умеренную гипотермию, искусственное кровообращение и гемодилюцию и характеризовалось тромбоцитопенией со значительным угнетением тромбоцитарной активности, дефицитом внутреннего и внешнего механизма коагуляционного звена гемостаза, гипофибриногемией, дефицитом естественных антикоагулянтов [4, 7].

В дальнейшем (через 24 ч) выявлены значимые различия между группами – в группе цель-ориентированной терапии отмечено большее уменьшение выраженности данных проявлений и возвращение их к дооперационным показателям, а в группе со стандартным протоколом гемостатической терапии отмечены более выраженные дефицит внутреннего и внешнего механизма коагуляции, сохранение более глубокой гипофибриногемии, тромбоцитопении [19]. Многие исследования связывают такие изменения с тяжелым послеоперационным кровотечением [13, 22]. Также в группе со стандартным протоколом коррекции геморрагического синдрома был значимо ниже уровень гемоглобина, что свидетельствует о более обильном и длительном кровотечении в данной группе по сравнению с группой цель-ориентированной терапии. Ни на одном из этапов исследования в группах не был выявлен гиперфибринолиз. По-видимому, роль гиперфибринолиза в потенцировании послеоперационной кровоточивости у детей раннего возраста кардиохирургического профиля преувеличена [24, 29].

Через 24 ч после операции в группах отмечена значимо разная величина АСТ и «индекса гепаринизации» – в группе со стандартным протоколом эти показатели были выше, и это несмотря на больший объем применения протамина в этой группе. Эти факты свидетельствуют о низкой эффективности применения протамина при стандартном протоколе гемостатической терапии: во-первых, часто анестезиолог не ждет, а временами не повторяет тест АСТ, а просто вводит дополнительную дозу протамина при кровотечении; во-вторых, в условиях гипофибриногемии и тромбоцитопении АСТ может быть увеличено, а применение избыточной дозы протамина может приводить к значимым нарушениям тромбоцитарного звена гемостаза, ухудшая взаимодействие

тромбоцитарных рецепторов GPIIb и фактора Виллебранда, тем самым приводя к увеличению кровоточивости. Необоснованное избыточное использование протамина также обсуждается многими исследователями [17]. Нужно отметить, что стандартная гемостатическая терапия, проводимая после основного этапа операции, основана в большей степени на опыте анестезиолога, так как контроль всех нужных показателей стандартных лабораторных тестов возможен лишь через 1,5–2 ч после взятия проб, объем которых может составлять от 2 до 4 мл крови. В операционной доступно лишь оперативно получить информацию о показателях АСТ и количестве тромбоцитов. Поэтому при возникновении кровотечения гемостатическая терапия носит избыточный характер и зачастую не обоснована. В результате, несмотря на высокую частоту и объем гемостатической терапии при значимом кровотечении, коррекция его может быть малоэффективна и небезопасна для пациента [16, 23].

Применение протокола цель-ориентированной терапии, включающего показатели ТЭГ, позволяет получить полное документированное представление о состоянии системы гемостаза больного (первичные результаты в течение 15–20 мин), используя всего 1 мл крови. Важным условием является наличие тромбоэластографа в непосредственной близости от больного и наличие знаний и опыта работы с тромбоэластографом у лечащего врача. При помощи ТЭГ можно выявить любую типовую проблему гемостаза: избыточную гепаринизацию, дефицит факторов свертывания крови, фибриногена, недостаточность активности тромбоцитов, гиперфибринолиз. Гемостатики назначаются по строгим показаниям, а не эмпирически, как при стандартном протоколе. В результате объем и частота использования гемокомпонентов значительно меньше, а кровотечение и явления коагулопатии купируются быстрее, чем при использовании стандартного протокола гемостатической терапии. Таким образом, такая терапия эффективнее, что доказывают многочисленные исследования, выполненные у взрослых больных [8, 21, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование подтверждает эффективность цель-ориентированной гемостатической терапии при кровотечениях у новорожденных и детей раннего возраста после кардиохирургических операций в условиях ИК и может быть рекомендовано к применению у детей данной возрастной группы. Для его эффективного использования необходимо: нахождение

тромбоэластографа в непосредственной близости от больного (т.е. в палате ОРИТ непосредственно), а также умение его использовать сотрудниками ОРИТ; использование проб крови, стабилизированных цитратом натрия (1:9); постановка проб должна осуществляться в пределах не позднее 10–15 мин с момента забора крови; на преаналитическом этапе должна быть исключена контаминация гепарина из промывочных растворов. Необходимо применять гемостатическую терапию только после согревания больного при наличии интенсивного кровотечения со значимой кровопотерей и лабораторных показаний. При продолжающемся интенсивном кровотечении и нормальных показателях лабораторных тестов необходимо ставить вопрос о поиске хирургического источника кровотечения, а не использовать гемостатики.

ВЫВОДЫ

Применение цель-ориентированной терапии у новорожденных и детей раннего возраста снижает объем общей кровопотери на 34,5 % (на 10 мл/кг), тяжесть СПОН в 2 раза, частоту регистрации коагулопатии в раннем послеоперационном периоде на 21,6 %, длительность ИВЛ на 33 %, сроки пребывания в ОРИТ на 33,3 %, частоту реанимационных мероприятий после операции на 25 %, 30-дневную смертность на 15 % и увеличивает выживаемость пациентов ($p = 0,18$ для логрангового критерия, $p = 0,13$ для обобщенного критерия Уилкоксона) по сравнению со стандартным протоколом гемостатической терапии.

Применение цель-ориентированной терапии уменьшает частоту применения отмытых эритроцитов и концентратов факторов свертывания на 20 %, СЗП на 18,3 %, криопреципитата на 21,6 %, тромбомассы на 30 %, антифибринолитиков на 29,7 % и протамина на 33,3 %. Также значительно снижаются объемы используемых эритроцитарной массы (на 57 %), СЗП (на 53,3 %), тромбомассы (на 60,7 %) и криопреципитата (на 54,1 %) по сравнению со стандартным протоколом гемостатической терапии.

Описанный в исследовании протокол цель-ориентированной терапии может быть рекомендован к клиническому использованию у новорожденных и детей до 1 года при послеоперационных кровотечениях после операций на сердце.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буланов А.Ю. Роль тромбоэластографии в трансфузионной терапии посттравматической коагулопатии // Трансфузиология. 2011. 12. (4). 47–55.

2. Буланов А.Ю., Городецкий В.М. Тромбоэластографическая оценка системы гемостаза и эффективность ее коррекции перед оперативными вмешательствами у больных с заболеваниями системы крови // Гематология и трансфузиология. 2012. 57. (5). 36–42.

3. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М., 2005. 227 с.

4. Козар Е.Ф., Плющ М.Г., Самсонова Н.Н., Климович Л.Г. Состояние гемостаза у больных врожденными пороками сердца до и после хирургической коррекции // Тромбоз, гемостаз и реология. 2001. (6) 27–30.

5. Леонов Н.П., Караськов А.М., Струнин О.В. и др. Влияние кровопотери на степень тяжести полиорганной недостаточности у детей раннего возраста с врожденными пороками сердца, оперированных в условиях гипотермического искусственного кровообращения // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2012. (5) 71–74

6. Фуражков Д.А., Свалов А.И., Захаров Е.В. и др. Методы ультрафильтрации как способ регуляции гидробаланса при коррекции транспозиции магистральных артерий у новорожденных детей // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014. (3). 24–26.

7. Чарная А.В. Патогенез нарушений системы гемостаза при кардиохирургических операциях: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2007.

8. Anderson L., Quasim I., Soutar R. et al. An audit of red cell and blood product use after the institution of thromboelastometry in a cardiac intensive care unit // Transfusion Med. 2006. 16. (1). 31–39.

9. Andropoulos B., Stayer S.A., Russell I.A. Anesthesia for congenital heart disease. Wiley-Blackwell, 2008. 512 p.

10. Chan K.L., Summerhayes R.G., Ignjatovic V. et al. Reference values for kaolin-activated thromboelastography in healthy children // Anesth. Analg. 2007. 105. 1610–1613.

11. Chapman M.P., Moore E.E., Ramos C.R. et al. Fibrinolysis greater than 3% is the critical value for initiation of antifibrinolytic therapy // J. Trauma Acute Care Surg. 2013. 75. (6). 961–967.

12. Edwards R.M., Naik-Mathuria B.J., Gay A.N. et al. Parameters of thromboelastography in healthy newborns // Am. J. Clin. Pathol. 2008. 130. 99–102.

13. Faraoni D., Willems A., Savan V. et al. Plasma fibrinogen concentration is correlated with postoperative blood loss in children undergoing cardiac surgery // Eur. J. Anaesthesiol. 2014. 31. 317–326.

14. Gando S., Iba T., Eguchi Y. et al. A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria // Crit. Care Med. 2006. 34. (3). 625–631.

15. Goobie S.M., Soriano S.G., Zurakowski D. et al. Hemostatic changes in pediatric neurosurgical patients

- as evaluated by thrombelastograph // *Anesth. Analg.* 2001. 93. 887–892.
16. Khan H., Belsher J., Yilmaz M. et al. Fresh-frozen plasma and platelet transfusions are associated with development of acute lung injury in critically ill medical patients // *Chest.* 2007. 131. (5). 1308–1314.
17. Khan N.U., Wayne C.K., Barker J., Strang T. The effects of protamine overdose on coagulation parameters as measured by the trombelastograph // *Eur. J. Anaesthesiol.* 2010. 27. 624–627.
18. Leteurre S., Martinot A., Duhamel A. et al. Development of a pediatric multiple organ dysfunction score: use of two strategies // *Med. Decis. Making.* 1999. 19. (4). 399–410.
19. Miller B.E., Guzzetta N.A., Tosone S.R., Levy J.H. Rapid evaluation of coagulopathies after cardiopulmonary bypass in children using modified thromboelastography // *Anesth. Analg.* 2000. 90. 1324–1330.
20. Moganasundram S., Hunt B.J., Sykes K. et al. The relationship among thromboelastography, hemostatic variables, and bleeding after cardiopulmonary bypass surgery in children // *Anesth. Analg.* 2010. 110. 995–1002.
21. Nuttall G.A., Oliver W.C., Santrach P.J. et al. Efficacy of a simple intraoperative transfusion algorithm for nonerythrocyte component utilization after cardiopulmonary bypass // *Anesthesiology.* 2001. 94. 773–778.
22. Orlov D., McCluskey S.A., Selby R. Platelet dysfunction as measured by a point-of-care monitor is an independent predictor of high blood loss in cardiac surgery // *Anesth. Analg.* 2014. 118. 257–263.
23. Ranucci M., Carlucci C. Duration of red blood cell storage and outcomes in pediatric cardiac surgery: an association found for pup prime blood // *Crit. Care.* 2009. 13. (6). ID R207.
24. Ranucci M., Simioni P. Point-of-care tests for severe hemorrhage. A manual for diagnosis and treatment. Springer Switzerland, 2016. 211 p.
25. Shore-Lesserson L., Manspeizer H.E., DePerio M. et al. Thromboelastography-guided transfusion algorithm reduces transfusions in complex cardiac surgery // *Anesth. Analg.* 1999. 88. 312–319.
26. Tirosch-Wagner T., Strauss T., Rubinshtein M. et al. Point of care testing in children undergoing cardiopulmonary bypass // *Pediatr. Blood Cancer.* 2011. 56. 794–798.
27. Wang S.C., Lin H.T., Chang K.Y. et al. Use of higher tromboelastogram transfusion values is not associated with greater blood loss in liver transplant surgery // *Liver Transpl.* 2010. 18. 1254–1258.
28. Williams G.D., Bratton S.L., Ramamoorthy C. Factors associated with blood loss and blood product transfusions: A multivariate analysis in children after open-heart surgery // *Anesth. Analg.* 1999. 89. 57–64.
29. Williams G.D., Bratton S.L., Nielsen N.J. et al. Fibrinolysis in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 1998. 12. 633–638.
30. Wolf M., Maher K., Kanter K. et al. Early postoperative bleeding is independently associated with increase surgical mortality in infants after cardiopulmonary bypass // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014. 148. 631–636.

COMPARATIVE STUDY OF METHODS FOR CORRECTION OF HEMORRHAGIC SYNDROM IN NEWBORNS AND INFANTS AT THE CARDIAC SURGERY

**Nikolai Petrovich LEONOV, Alexandr Mikhailovich KARASKOV,
Oleg Vsevolodovich STRUNIN**

*Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology n.a. academician Ye. Meshalkin
of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15*

Purpose of the study. Comparative study of methods for correction of hemorrhagic syndrome in newborns and infants was carried out at cardiac surgery as a result of a prospective study. Materials and methods. 120 patients were selected and randomized using the method of «envelopes» into two equal groups: using goal-oriented therapy and standard hemostatic therapy. Statistical comparisons of clinical and laboratory data were performed. Results and discussion. We have proved that the use of goal-oriented therapy twice reduces the severity of organ failure, reduces the severity of the hemorrhagic syndrome by 35 %, decreases the frequency of use (by 20–30 %) and volumes (by 50–60 %) of hemostatic drugs and blood products, shortens the duration of post-operative period by 30 % and increases the survival rate by 15 % as compared to the standard protocol of hemostatic therapy. The used protocol of the goal-oriented therapy can be recommended for clinical use in cardiac patients of this age group with bleeding.

Key words: bleeding, hemorrhagic syndrome, newborns, infants, goal-oriented therapy, thromboelastography.

*Leonov N.P. – postgraduate student, anesthesiologist-intensivist of intensive care unit, e-mail: NikoLeonov@ya.ru
Karaskov A.M. – academician of RAS, doctor of medical sciences, professor, director
Strunin O.V. – doctor of medical sciences, anesthesiologist-intensivist, head of the intensive care unit*