© Коллектив авторов, 2020
УДК 616.25-002.28.3:616.712
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15080>
ISSN – 2073-8137

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ АДГЕЗИОГЕНЕЗА ПРИ ОСТАТОЧНЫХ ПЛЕВРАЛЬНЫХ ПОЛОСТЯХ

А. В. Калашников¹, С. А. Калашникова¹, А. А. Воробьев²,
Д. Ш. Салимов³, С. Ш. Айдаева¹

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета, Пятигорск, Российская Федерация

² Волгоградский государственный медицинский университет, Российская Федерация

³ Центральный военный клинический госпиталь им. П. В. Мандрыка, Москва, Российская Федерация

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF BIOLOGICAL STIMULATION OF ADHESIOGENESIS IN RESIDUAL PLEURAL CAVITIES

Kalashnikov A. V.¹, Kalashnikova S. A.¹, Vorobyov A. A.², Salimov D. Sh.³, Aidaeva S. Sh.¹

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russian Federation

² Volgograd State Medical University, Russian Federation

³ P. V. Mandryk Central Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Представлены данные сочетанного применения плазмолифтинга и липофилинга как способа биологической стимуляции адгезиогенеза в экспериментальном лечении остаточных плевральных полостей при хронической эмпиеме плевры у 300 крыс-самцов. Совместное введение крысам аутологичной гомогенизированной жировой эмульсии и плазмы, обогащенной тромбоцитами, обеспечило снижение показателя летальности в 33,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой сравнения без лечения (негативный контроль) и в 3,9 раза ($p < 0,05$) при лечении доксициклином (позитивный контроль).

Ключевые слова: адгезиогенез, остаточная плевральная полость, эмпиема плевры, липофилинг, PRP-технология

Data on the combined use of plasmolifting and lipofilling as a method of biological stimulation of adhesiogenesis in the experimental treatment of residual pleural cavities in chronic pleural empyema in 300 male rats are presented. Co-administration of autologous homogenized fat emulsion and platelet-rich plasma to rats resulted in a 33.4-fold reduction in mortality ($p < 0.001$) compared to the comparison group without treatment (negative control) and 3.9-fold ($p < 0.05$).

Keywords: adhesiogenesis, residual pleural cavity, pleural empyema, lipofilling, PRP technology

Для цитирования: Калашников А. В., Калашникова С. А., Воробьев А. А., Салимов Д. Ш., Айдаева С. Ш. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ АДГЕЗИОГЕНЕЗА ПРИ ОСТАТОЧНЫХ ПЛЕВРАЛЬНЫХ ПОЛОСТЯХ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):338–342. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15080>

For citation: Kalashnikov A. V., Kalashnikova S. A., Vorobyov A. A., Salimov D. Sh., Aidaeva S. Sh. EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF BIOLOGICAL STIMULATION OF ADHESIOGENESIS IN RESIDUAL PLEURAL CAVITIES. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(3):338–342. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15080> (In Russ.)

ASC – аутологичные жировые стволовые клетки
HA – гиалуроновая кислота

MSC – мезенхимальные стромальные клетки
PRP – плазма, обогащенная тромбоцитами

Сложности ведения пациентов с нагноительными заболеваниями лёгких и плевры с остаточной плевральной полостью определяются существенным увеличением их числа, полиэтиологичностью и коморбидностью больных [1, 2]. Недостаточная эффективность хирургических методов, их многоэтапность, неопределенность с внедрением инновационных методик, в частности использование стволовых клеток, результаты применения плазмы, обогащенной тромбоцитами

(PRP), гиалуроновой кислоты (HA) и гидрогелей [3–5] актуализируют поиск новых подходов в лечении пациентов с остаточными плевральными полостями. Существенный прогресс в понимании эффективности, изучение точных механизмов стимуляции регенеративных процессов в тканях при применении плазмолифтинга и липофилинга в медицинской практике [6–8] делают перспективным их изучение в экспериментальных условиях на модели остаточных плевральных полостей.

Цель исследования – в эксперименте обосновать сочетанное применение плазмолифтинга и липофилинга как способа биологической стимуляции адгезиогенеза в лечении остаточных плевральных полостей.

Материал и методы. Экспериментальное исследование проведено на 300 нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–210 г. У всех животных была воспроизведена хроническая эмпиема плевры с формированием остаточной плевральной полости путем троекратного (с интервалом в 7 суток) введения лабораторным животным в V межреберье по подмышечной линии в левую плевральную полость в течение 8 недель бактериальной взвеси *E. coli* в физиологическом растворе в количестве не менее 10^9 КОЕ/мл в объеме 1 мл, с последующим 21-дневным перерывом в манипуляциях с целью отграничения патологического процесса.

После воспроизведения эмпиемы плевры животные были разделены на 5 групп по 60 животных в каждой: I группа сравнения (негативный контроль), в остаточную полость которым вводили 1 мл стерильного физиологического раствора; II группа сравнения (позитивный контроль), в полость эмпиемы которым вводили 10 мг доксицилина в 1 мл. Животных III опытной группы вели с применением PRP-технологии: еженедельно вводили в остаточную плевральную полость 1 мл аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, полученной путём центрифугирования венозной крови реципиента в пробирке (Набор для забора крови Plasmolifting™, ООО «Плазмолифтинг», Казань, Россия). Животным IV опытной группы стимуляцию спайкообразования осуществляли с применением методики липофилинга: в асептических условиях из подкожно-жировой клетчатки передней брюшной стенки забирали 50 мг жировой ткани, получали водно-жировую эмульсию с помощью гомогенизатора Minilys («Bertin Tec», USA). Полученную взвесь вводили в остаточную плевральную полость. Животным V опытной группы для заполнения полости эмпиемы выполнялось сочетанное введение жировой ткани реципиента и плазмы, обогащенной тромбоцитами.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 30-е сутки послеоперационного периода. Проводилось комплексное макро- и микроскопическое исследование остаточной плевральной полости. На секции производился забор плевры и легкого с мест интраплеврального введения, забор спаек проводили с максимальным сохранением точек прикрепления. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине, в проводкой по стандартной методике, срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону. Микрофотосъемку осуществляли на компьютерно-аппаратном комплексе Canon Power Shot A 510.

Статистическая обработка результатов проведена общепринятыми для медико-биологических исследований методами с помощью программных пакетов EXCEL 7.0 (Microsoft, USA) и АРКАДА (Диалог-МГУ, Россия). Достоверность различий выборок оценивали по критерию Стьюдента (*t*) и соответствующему ему показателю достоверности (*p*). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В I группе крыс, которым не проводилось лечение, летальность составила 56,7 % (34 животных погибло от полиорганной недостаточности, возникшей на фоне сепсиса с локализацией септического очага в плевральной полости). В конце эксперимента у 100 % выживших животных определялась остаточная полость различного объ-

ема, заполненная жидким гнойным экссудатом без признаков спайкообразования. Макроскопически определялось утолщение париетальной и висцеральной плевры; субплеврально на париетальной плевре располагались единичные абсцессы диаметром 3 мм без признаков организации (рис. 1А).

В плевральной полости у крыс, которым проводилось лечение доксициклином (II группа), летальность составила 6,7 % (4 крысы). На 30-е сутки остаточные плевральные полости обнаружены в 42,0 % случаев, при этом только у 13 крыс полость была заполнена гноем и детритом. У 16 крыс (55,2 % случаев) выявлена сухая остаточная плевральная полость. Обнаружены единичные массивные шварты, представленные зрелыми спайками преимущественно в нижних отделах, признаки воспаления в зоне спайки отсутствовали (рис. 1Б). Гнойный экссудат определялся в незначительном количестве. Под висцеральной плеврой субплеврально располагались инкапсулированные скопления гноя по типу абсцессов, плотной консистенции, размерами 3–4 мм.

Летальность в III и IV группах составила 1,7 % (по 1 животному в каждой группе). Макроскопически лечебный эффект в данных группах оказался сходным (рис. 1В): выявлено утолщение париетальной и висцеральной плевры, остаточные полости имели щелевидную форму, средний их поперечный размер составил $3,01 \pm 0,09$ мм. Гнойный экссудат отсутствовал, определялось незначительное количество серозного содержимого, обнаружены зрелые спайки.

При сочетанном применении технологий плазмолифтинга и липофилинга наблюдался максимальный положительный эффект, при этом летальность, как и в предыдущих опытных группах, составила 1,7 % (1 животное). Остаточная полость не визуализировалась в 41,7 % случаев (у 25 животных), экссудат отсутствовал (рис. 1Г). Заращение полости обеспечивалось ее заполнением множественными зрелыми спайками различной толщины: от $0,48 \pm 0,08$ мм в верхних отделах до $1,53 \pm 0,09$ мм – в нижних.

При гистологическом исследовании тканей плевральной полости в исследуемых группах выявлены существенные отличия. В I группе животных обнаружены явные признаки гнойного воспаления с инфильтрацией нейтрофилами, с кровоизлияниями, признаками периваскулярного отека, разволокнения сосудистой стенки и наличием оптически пустых периваскулярных пространств (рис. 2А).

Применение доксицилина способствовало образованию незрелых спаек в плевральной полости, которые располагались хаотично по отношению к листкам плевры. Спайки характеризовались наличием рыхлой волокнистой соединительной ткани, где тонкие соединительнотканые волокна имели различное направление с обилием умеренно полнокровных сосудов. Между волокнами соединительной ткани четко визуализировалось большое количество фибробластов, которые имели округлые ядра и незначительное количество цитоплазмы. Наблюдалась лимфоцитарная инфильтрация с наличием единичных плазматических клеток. Обращали на себя внимание сосуды микроциркуляторного русла, выстланные эндотелиоцитами, с округлым ядром, что свидетельствовало о наличии признаков так называемого «раздражения» и возможного развития эндотелиальной дисфункции (рис. 2Б).

В плевральных полостях III и IV экспериментальных групп наблюдалось образование множественных спаек с наличием ориентированных соединительнотканых волокон, в которых определялись фибробла-

Рис. 1. Макроскопическая картина хронической эмпиемы плевры на 30-е сутки эксперимента:

А – гнойный экссудат в плевральной полости, отсутствие спаечного процесса;

Б – остаточная плевральная полость содержит незначительное количество гнойного экссудата, единичные зрелые спайки;

В – субтотальное заращение остаточной плевральной полости при отсутствии экссудата, массивное спайкообразование;

Г – тотальное заращение полости эмпиемы зрелыми спайками, свободная полость не определялась

сты и фиброциты с вытянутым ядром, незначительное количество цитоплазмы. Морфологические признаки воспаления были минимальны и характеризовались наличием единичных лимфоцитов и плазматических клеток (рис. 2В), а при введении аутологичного гомогенизированного жира – участками жировой ткани, представленной адипоцитами.

На фоне сочетанного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, и аутологичного гомогенизированного жира наблюдалось полное облитерирование плевральной полости, которое гистологически характеризовалось наличием соединительнотканых волокон, участков жировой ткани, умеренно полнокровных сосудов. Волокна соединительной ткани были четко ориентированы между париетальным и висцеральным листками, к которым прилежала жировая ткань, представленная адипоцитами типичного строения. Сосуды микроциркуляторного русла были умеренного кровенаполнения. Также отмечались единичные лимфоциты и незначительные признаки отека ткани (рис. 2Г).

Таким образом, установлены достоверные различия в летальности у животных из групп сравнения и опытных групп: применение доксицилина снижало данный показатель в 8,5 раза ($p < 0,01$) по отношению к данным I группы, а летальность крыс опытных групп оказалась в 3,9 раза ниже, чем при использовании доксицилина ($p < 0,05$).

Обращает внимание факт, что при лечении доксициклином спайки состояли преимущественно из рыхлой волокнистой соединительной ткани, инфильтрированной лейкоцитами, лимфоцитами и макрофагами, что подтверждает наличие активного воспаления в спайке и является прогностически неблагоприятным, так как не исключает риск развития бесконтрольного тотального спаечного процесса в плевральной полости.

В то же время у крыс III, IV и V опытных групп спайки были сформированы преимущественно коллагеновыми и эластическими волокнами с умеренной лимфогистиоцитарной инфильтрацией. Описанная гистологическая картина характерна для зрелых спаек, а следовательно, при точечном введении аутологичной жировой ткани и плазмы, обогащенной тромбоцитами, в остаточную плевральную полость адгезиогенез является контролируемым.

Заключение. Биологический адгезиогенез дает возможность стимулировать спайкообразование в плевральной полости при остаточных плевральных полостях после перенесенных нагноительных заболеваний лёгких и плевры с формированием плевральных спаек, способствующих скорейшему заращению остаточной плевральной полости. Совместное применение методик по доставке адипоцитов с использованием плазмодифтинга в качестве транспортного средства дополнительно обе-

Рис. 2. Микроскопическая картина остаточной плевральной полости на фоне хронической эмпиемы плевры, 30-е сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином):

- А – диффузное пропитывание и утолщение плевральных листков, отек соединительной ткани, нейтрофильный экссудат по всему полю зрения, участки гнойного расплавления тканей. Ув. $\times 200$;
Б – единичные хаотично расположенные незрелые спайки в плевральной полости, рыхлая волокнистая соединительная ткань, с единичными гранулами гемосидерина, крупные клетки с наличием в цитоплазме бурого пигмента (сидерофаги). Ув. $\times 400$;
В – зрелые спайки, отсутствие экссудата, незначительное количество лимфоцитов. Ув. $\times 400$;
Г – зрелые спайки, представленные соединительнотканскими волокнами, участки скопления адипоцитов типичного строения. Ув. $\times 200$

спечивающих благоприятную микросреду клеток позволяет трансформироваться в соединительную ткань в пределах одного мезенхимального листка. Использование сочетанного применения плазмолифтинга и липофилинга при лечении остаточной плевральной полости относится к малоинвазивным методикам, позволяет избежать объёмных реконструктивно-пластических операций.

Информированное согласие: Экспериментальное исследование проведено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики, изложенными в национальном стандарте «Принципы

надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434–2009, с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о «Защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1986), в соответствии с «Общими этическими принципами, соответствующими животным» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и положительным заключением этического комитета.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Tan P. S. C., Badieli A., Fitzgerald D. B., Kuok Y. J., Lee Y. C. G. Pleural empyema in a patient with a perinephric abscess and diaphragmatic defect. *Resp. Case Rep.* 2019;7(3):e00400. <https://doi.org/10.1002/rcr2.400>
2. Варин А. А., Ханин А. Л., Развозжаев Ю. Б. Организация врачебной помощи при болезнях плевры. *Вестник современной клинической медицины.* 2015;8(1):17-23. [Varin A. A. Khanin A. L., Razvozhayev Yu. B. Organization of medical care for pleural diseases. *Vestnik sovremennoj klinicheskoy mediciny. – Bulletin of modern clinical medicine.* 2015;8(1):17-23. (In Russ.)].
3. Petrella F., Spaggiari L., Acocella F., Barberis M., Bellomi M. [et al.]. Airway fistula closure after stem-cell infusion. *New Engl. J. Med.* 2015;372(1):96-97. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1411374>
4. Hsieh H. Y., Lin W. Y., Lee A. L., Li Y. C., Chen Y. J. [et al.]. Hyaluronic acid on the urokinase sustained release with a hydrogel system composed of poloxamer 407: HA/P407 hydrogel system for drug delivery. *PLoS One.* 2020;15(3):e0227784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227784>
5. Bribiesco A., Patterson G. A. Management of Postpneumectomy Bronchopleural Fistula: From Thoracoplasty

- to Transsternal Closure. *Thor. Surg. Clin.* 2018;28(3):323-335. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.05.008>
6. Lei X., Xu P., Cheng B. Problems and Solutions for Platelet-Rich Plasma in Facial Rejuvenation: A Systematic Review. *Aesthetic Plastic Surg.* 2019;43(2):457-469. <https://doi.org/10.1007/s00266-018-1256-1>
7. de Souza Tolentino E., de Castro T. F., Michellon F. C., Passoni A. C. C., Ortega L. J. A. [et al.]. Adjuvant therapies in the management of medication-related osteonecrosis of the jaws: Systematic review. *Head Neck.* 2019;41(12):4209-4228. <https://doi.org/10.1002/hed.25944>
8. Eshtiaghi P., Sadownik L. A. Fact or Fiction? Adipose-Derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Vulvar Lichen Sclerosus. *J. Lower Gen. Tract Dis.* 2019;23(1):65-70. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000440>

Сведения об авторах:

Калашников Антон Владимирович, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой хирургических дисциплин; тел.: 89283359429; e-mail: cospmpharm@yandex.ru

Калашникова Светлана Александровна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой морфологии; тел.: 89023848447; e-mail: kalashnikova-sa@yandex.ru

Воробьев Александр Александрович, заслуженный деятель науки, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии; тел.: 89093806614; e-mail: cos@volgmed.ru

Салимов Дмитрий Шамилович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением; тел.: 89023848447; e-mail: salimow.dmitry@yandex.ru

Айдаева Салихат Шамиловна, преподаватель кафедры морфологии; тел.: 89195490918; e-mail: ajdaeva-salihat@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 618.145:616-007.61:577.15+57.042.2:577.175.14

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15081>

ISSN – 2073-8137

СОСТОЯНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И АПОПТОЗА В ЭНДОМЕТРИИ ПРИ ГИПЕРПАЗИЯХ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

О. В. Карапетян, И. И. Фомочкина, Е. Ю. Зяблицкая, В. А. Кубышкин,
Е. П. Коваленко, П. Г. Коробова, Т. П. Макалиш, А. В. Кубышкин

Медицинская академия им. С. И. Георгиевского Крымского федерального
университета им. В. И. Вернадского, Симферополь, Российская Федерация

THE STATE OF LOCAL MARKERS OF INFLAMMATION AND APOPTOSIS IN ENDOMETRY IN HYPERPLASIA OF VARIOUS DEGREES OF SEVERITY

Karapetyan O. V., Fomochkina I. I., Zyablitskaya E. Yu., Kubyshkin V. A.,
Kovalenko E. P., Korobova P. G., Makalish T. P., Kubyshkin A. V.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of V. I. Vernadsky
Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

Проведен анализ состояния локальных маркеров воспаления и факторов апоптоза в эндометрии при гиперплазии эндометрия (ГЭ) различного типа у 89 пациенток фертильного возраста. Показано превалирование неспецифической воспалительной реакции с усилением экспрессии общего лейкоцитарного антигена (CD45), наиболее выраженной при атипической гиперплазии, на фоне отсутствия явных изменений в популяции натуральных киллеров (CD56), фагоцитарной активности тканевых макрофагов (CD68) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8a). Усиление неспецифического воспаления подтверждалось активацией провоспалительных цитокинов в маточных смывах и повышением протеолитической активности (трипсина- и эластазоподобной активности) на фоне снижения ингибиторного потенциала (антитриптической активности и, особенно, кислотостабильных ингибиторов). Нарастание воспалительной реакции в эндометрии при атипической гиперплазии сопровождалось понижением экспрессии CD95, что свидетельствует о параллельном снижении готовности клеток эндометрия к апоптозу. Рост неспецифического воспаления и снижение готовности к апоптозу могут быть факторами, способствующими формированию эндометриальной аденокарциномы.

Ключевые слова: воспаление, канцерогенез, апоптоз, маркеры, протеиназы, цитокины, факторы роста, гиперплазия эндометрия, макрофаги

The analysis of the state of local markers of inflammation and apoptosis factors in the endometrium in case of endometrial hyperplasia (EH) of various types in 89 patients of fertile age was carried out. There was shown the prevalence of a nonspecific inflammatory reaction with an increase in the expression of total leukocyte antigen (CD45), most pronounced in atypical hyperplasia, against the background of the absence of obvious changes in the population of natural killer cells (CD56), phagocytic activity of tissue macrophages (CD68) and cytotoxic T-lymphocytes (CD8a). An increase in nonspecific inflammation was confirmed by the activation of pro-inflammatory cytokines in uterine washes and an increase in proteolytic